OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	外側手綱核から三叉神経中脳路核への投射とその機能
Author(s)	大原, 春香
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/52329
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

学 位 論 文

外側手綱核から三叉神経中脳路核への投射とその機能

大阪大学大学院歯学研究科
分子病態口腔科学専攻顎顔面口腔矯正学

大原　春香

［要旨］

歯根膜や閉口筋筋紡錘に生ずる深部感覚を伝達する三叉神経中脳路核（Vmes）ニューロンは、頭頸部の運動に関わっている。Vmesニューロンは一次ニューロンでありながら、その細胞体が脳内に有るので、その細胞体には脳内の多くの部位からの入力があることが既に知られている。外側手綱核（lateral habenula, LHb）は負の報酬時に活動し、ストレスやうつとの関連が注目されている。しかし、LHbが上記のVmesニューロンの機能の発現、制御にも関与しているかどうかは不明である。そこで本研究では、LHbのVmesが関わる機能への関与、特にストレス負荷時の関与をラットで明らかにすることをめざした。逆行性トレーサーであるFluorogoldのVmesへの注入と、順行性トレーサーであるbiotinylated dextranamineのLHbへの注入によって、（1）LHbからVmesニューロンの細胞体への直接投射と、（2）LHbから背側縫線核または正中縫線核への投射を介したVmesニューロンの細胞体への間接投射が明らかになり、また（3）LHbからrostromedial tegmental nucleus（RMTg）への投射を介したVmesニューロンの細胞体への間接投射が示唆された。拘束ストレスをラットに与えて発現したc-Fos陽性のLHbニューロンの検索を行い、拘束ストレス負荷で、（4）LHbニューロンが賦活されること、（5）（1）のLHb-Vmes路が賦活されること、（6）（2）のLHb-(背側縫線核または正中縫線核)-Vmes路と（3）のLHb-RMTg-Vmes路が賦活される可能性が示唆された。

本研究によって、Vmesニューロンが関与する頭頸部の運動機能が、LHbニューロンの直接的または間接的な影響を受けていること、またその運動機能がストレスの影響を受ける可能性が示された。

[略語一覧]

4	trochlear nucleus、滑車神経核
ABC	avidin-biotin-peroxidase complex
Agl	lateral agranular cortex、無顆粒皮質外側部
Agm	medial agranular cortex、無顆粒皮質内側部
AI	agranular insular cortex、無顆粒性島皮質
Aq	cerebral aqueduct、中脳水道
BDA	biotinylated dextranamine
Bar	Barrington’s nucleus
cc	corpus callosum、脳梁
CL	central lateral nucleus of the thalamus、視床外側中心核
CM	central medial nucleus of the thalamus、視床内側中心核
DI	dysgranular insular cortex、不全顆粒性島皮質
DMTg	dorsomedial tegmental area、背内側被蓋野
DR	dorsal raphe nucleus、背側縫線核
DTg	dorsal tegmental nucleus、背側被蓋核
En	endopiriform nucleus、内梨状核
f	fornix、脳弓
FG	Fluorogold
fr	fasciculus retroflexus、反屈束
GI	granular insular cortex、顆粒性島皮質
Hb	habenula、手綱核
ic	internal capsule、内包
IC	inferior colliculus、下丘
IMD	intermediodorsal nucleus of the thalamus、視床背内側核間核
LC	locus ceruleus、青斑核
LD	laterodorsal nucleus of the thalamus、視床背側外側核
LDTg	laterodorsal tegmental nucleus、背外側被蓋核
lfp	longitudinal fasciculus of the pons、橋縦束
LH	lateral hypothalamic area、視床下部外側部
LHb	lateral habenula、外側手綱核
LHbL	lateral division of the lateral habenula、外側手綱核外側亜核
LHbM	medial division of the lateral habenula、外側手綱核内側亜核
LV	lateral ventricle、側脳室
MD	mediodorsal nucleus of the thalamus、視床背内側核

MHb	medial habenula、内側手綱核
ml	medial lemniscus、内側毛帯
mlf	medial longitudinal fasciculus、内側縦束
MnR	median raphe nucleus、正中縫線核
m5	motor root of trigeminal nerve、三叉神経運動根
mt	mammillothalamic tract、乳頭体視床路
NGS	normal goat serum、正常ヤギ血清
NHS	normal horse serum、正常ウマ血清
OPC	oval paracentral nucleus of the thalamus
PB	phosphate buffer、リン酸緩衝液
Pb	parabrachial nucleus、結合腕傍核
Pbl	lateral part of the Pb、結合腕傍核外側部
Pbm	medial part of the Pb、結合腕傍核内側部
PBS	phosphate buffered saline、リン酸緩衝食塩水
PC	paracentral nucleus of the thalamus、視床中心傍核
Pn	pontine nuclei、橋核
PnR	pontine raphe nucleus、橋縫線核
Po	posterior nucleus of the thalamus、視床後核群
PV	paraventricular nucleus of the thalamus、視床室傍核
py	pyramid、錐体
Re	reuniens nucleus of the thalamus、視床結合核
Rh	rhomboid nucleus of the thalamus、視床菱形核
RMTg	rostromedial tegmental nucleus
Rt	reticular nucleus of the thalamus、視床網様核
RtTg	reticulotegmental nucleus of the pons、 橋網様被蓋核
S1	primary somatosensory cortex、一次体性感覚野
S2	secondary somatosensory cortex、二次体性感覚野
s5	sensory root of trigeminal nerve、三叉神経知覚根
SC	superior colliculus、上丘
scp	superior cerebellar peduncle、上小脳脚
sm	stria medullaris of the thalamus、視床髄条
SO	superior olive、上オリーブ核
STh	subthalamic nucleus、視床下核
Sub	submedial thalamic nucleus、視床内側下核
Tz	nucleus of trapezoid body、台形体核
VL	ventral lateral nucleus of the thalamus、視床外側腹側核

VM	ventromedial nucleus of the thalamus、視床内側腹側核
Vmes	trigeminal mesencephalic nucleus、三叉神経中脳路核
Vmest	trigeminal mesencephalic tract、三叉神経中脳路
Vmo	trigeminal motor nucleus、三叉神経運動核
Vp	trigeminal principal nucleus、三叉神経主感覚核
VPL	ventral posterolateral nucleus of the thalamus、視床後外側腹側核
VPM	ventral posteromedial nucleus of the thalamus、視床後内側腹側核
VPpc	parvicellular part of the ventral posterior nucleus of thalamus、視床後腹側核小細胞部
Vsup	supratrigeminal nucleus、三叉神経上核
VTg	ventral tegmental nucleus、腹側被蓋核
Vtr	trigeminal spinal tract、三叉神経脊髄路
xscp	decussation of superior cerebellar peduncle、上小脳脚交叉
ZI	zona incerta of the thalamus、視床不確帯

[緒言]

三叉神経中脳路核（Vmes）ニューロンは、歯根膜や閉口筋筋紡錘に生ずる深部感覚を伝達する一次求心性ニューロンである。その中枢枝は、Probst束を下行して、同側の三叉神経上核、三叉神経運動核の中の閉口筋運動核、三叉神経間域、三叉神経傍域、延髄網様体、舌下神経核、疑核、頸髄などにも投射し（Probst, 1899; Corbin, 1940; Nomura and Mizuno, 1985; Shigenaga et al., 1988a, c, 1989, 1990; Capra and Wax, 1989; Dessem and Luo, 1999; Zhang et al., 2001, 2003, 2005）、咀嚼、嚥下、発声、呼吸、頭位の保持などの顎顔面口腔領域の機能の発現、制御に関与すると考えられている。

Vmesニューロンは一次求心性ニューロンでありながら、細胞体が脳内に存在する点で極めて特異である（Jhonston, 1909; Freeman, 1925; Capra and Wax, 1989; Luo and Li, 1991; Luo et al., 1991; Nieuwenhuys et al., 1998）。細胞体上に多数のシナプスが存在することが、電子顕微鏡や免疫組織学的手法を用いた研究により確認されており（Liem et al., 1992; Honma et al., 2001; Lazarov, 2002; Zhang and Luo, 2002; Zhang et al., 2004）、脳内の他の部位からの入力を受けている。我々は、大脳皮質からの直接投射が存在するが、体性感覚運動野からは稀で、自律神経系にかかわる前頭前皮質からの投射があることを明らかにした（Iida et al., 2010）。また他の研究者によって、自律神経系にかかわる視床下部（Nagy et al., 1986）、扁桃体（Shirasu et al., 2011; Lazarov et al., 2011）、縫線核（Tashiro et al., 1989; Copray et al., 1990b, 1991; Lazarov and Chouchkov, 1995）、青斑核（Takahashi et al., 2010）などからの直接投射も報告されている。よって、上述のVmesニューロンの顎顔面口腔領域の機能の発現と制御は、広範な自律神経系の影響を受けることが考えられる。しかし、自律神経関連脳部位からVmesニューロンへの投射の詳細とその機能に関しては未だ不明な点が多い。

手綱核（habenula, Hb）は視床の後背側に位置し、視床髄条とともに視床上部に分類される（Carpenter, 1991; Jones, 2007）。Hbは、外側手綱核（lateral habenula, LHb）と内側手綱

核（medial habenula, MHb）に二分されるが、両者は発生学的にも神経連絡からも別のグループとして分類されるべきものである（Herkenham and Nauta, 1977; Andres et al, 1999）。LHbの活動は、失望や望まない状況の予感を反映しており（Ullsperger and Cramon, 2003; Shepard et al., 2006）、報酬の取り消しや好まない刺激や結果がもたらされた時に亢進する（Matsumoto and Hikosaka, 2007, 2009）。よって、LHbは自律神経系の機能に関わる多様な身体機能や病状の発現に関与すると考えられている（Hikosaka, 2010; Matsumoto and Hikosaka, 2011）。近年、LHbのストレスや痛み、うつと関連した機能に注目が集まっている（Caldecott Hazard et al., 1988; Morris et al., 1999; Amat et al., 2001; Shumake et al., 2003; Sartorius et al., 2010; Li et al., 2011; Meng et al., 2011）。このような全身性の機能を持つLHbが、上述したVmesニューロンが関わる顎顔面口腔領域の機能の発現、制御にも関与していることが考えられるが、それを示す報告は未だされていない。

そこで本研究では、ラットを用い（1）LHbからVmesニューロンの細胞体への直接投射の有無とその投射様態の解明、および間接投射が存在する可能性の検討と、（2）その直接投射が、ストレス負荷時に働くかどうかの解明をめざした。

［方法］

実験は体重300～500 gのWistar 系雄性ラットを30匹用いた。実験に際しては、大阪大学大学院歯学研究科実験動物取り扱い指針とアメリカ合衆国のNIHのガイドラインに則し、使用する動物は最小限になるように努めた。麻酔はsodium pentobarbital (55 mg/kg) を腹腔内に投与し、実験中は麻酔深度を維持するために必要に応じてsodium pentobarbital (10 mg/kg) を追加投与した。組織侵襲部へはlidocaineの局所投与を行った。

体温と心電図をモニターし、生理学的範囲内に維持した。神経トレーサーの注入はすべて左側の脳に行った。神経トレーサーの定位注入と脳部位の細胞構築学的同定には、Paxinos and Watsonのアトラス (1998) とSwansonのアトラス (1992) を参照した。

実験は次の3部に分けて行った。

実験 1 : 逆行性トレーサーであるFluorogold (FG) のVmesへの注入

左側の咬筋を被覆する皮膚を切開後、咬筋内から咬筋神経を剖出した。これに電気刺激用双極性フック電極を装着した後、動物を脳定位固定装置に固定した。左側Vmesの上方の後頭部皮膚を切開し、後頭骨の一部を歯科用ドリルで除去後、その深部の脳硬膜を開窓した。2 M のクエン酸カリウム溶液を封入したガラス管微小電極 (支持部外径 1.5 mm、先端径 1 μm) を脳内に刺入し、左側咬筋神経の電気刺激 (200 μsec, 1 Hz) で誘発される誘発電位を記録してVmesの尾側部を同定した。電極を逆行性トレーサーである Fluorogold (FG, Fluorochrome, Englewood, CO) 1% を含む生理的食塩水を封入したガラス管微小電極 (先端径 15～20 μm) に換え、同定したVmesの尾側部に刺入した。FGを+電流 (2 μA) で電気泳動にて20分かけて微量注入した。これを18匹の動物に行なった。ガラス管微小電極を撤去後、骨欠損部を歯科用リン酸亜鉛セメントで被覆し、切開部皮膚を縫合した。抗生物質 (cefotiam hydrochloride, 66 mg/kg) と鎮痛薬 (flurbiprofen axetil, 3.3 mg/kg) を腹腔内投与し、麻酔からの回復後に動物ケージに戻した。

注入の5日後に麻酔薬の過剰投与下で、上行大動脈から0.02 M リン酸緩衝食塩水 (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（PB, pH 7.4）300 ml、10% シュクロースを含む0.02% PB（pH 7.4）100 mlを順次灌流した。

実験 2 ： 順行性トレーサーであるbiotinylated dextranamine（BDA）のLHbへの注入

実験1のVmesへのFG注入の結果、FG標識細胞が多数認められたLHbに、順行性トレーサーであるbiotinylated dextranamine（BDA, 10,000 MW, Molecular Probes, Eugene, OR）を注入した。動物を脳定位固定装置に固定した。左側LHbの上方の頭頂部皮膚を切開し、頭頂骨の一部を歯科用ドリルで除去後、その深部の脳硬膜を開窓した。0.01 M PBに溶解した4% BDAを封入したガラス管微小電極（支持部外径 1.5 mm、先端径 15～20 μm）を、脳図譜を参考にしてLHbに刺入した。BDAは+電流（2 μA）で電気泳動にて20分かけて微量注入した。これを12匹の動物に行なった。ガラス管微小電極を撤去後、骨欠損部を歯科用リン酸亜鉛セメントで被覆し、切開部皮膚を縫合した。抗生物質と鎮痛薬を腹腔内投与し、麻酔からの回復後に動物ケージに戻した。

注入の5-7日後に麻酔薬の過剰投与下で、実験1と同様に灌流固定した。

実験 3 ： ストレス負荷によるLHbニューロンの賦活の検索

実験1と同様の方法でVmesにFGを注入し、麻酔からの回復後に動物ケージに戻した。実験1と同様に注入の5日後に、動物を麻酔薬の過剰投与下で灌流固定したもの（コントロール群）と、灌流固定の2時間半前から直前までの間､拘束ストレスを与えたもの(ストレス群)の2群に分けた。ストレス群では、動物を床面上で背臥位にし、四肢を床面にテープで2時間半の間、固定した。それぞれ5匹ずつ行なった。

切片の作成と観察

灌流固定後に脳を摘出し、20% シュクロースを含む0.02 M PB（pH 7.4, 4℃）に2日間から3日間浸漬した。脳を凍結させ、厚さ65 μmの連続冠状切片を作成し、これを3セットに分けた。

実験1と3でFGを注入した動物の3セットの切片のうちの1セットは、反応や染色を行わず、ゼラチンで被覆したスライドガラスに貼り付けて乾燥させた。残り2セットと実験2でBDAを注入した

動物の3セットの切片は、それぞれ以下に示す反応を行った。

実験1でFGを注入した動物の切片は、3% ヤギ血清（NGS）を含む0.02 M PBS（pH 7.4）に30分間浸漬後、3% NGS、0.2% Triton-X と10,000倍希釈の抗FGウサギ抗体（Chemicon, CA）を含む0.02 M PBS（pH 7.4）に一晩浸漬した。その後、0.02 M PBSで切片を洗浄後、3% NGSに30分間浸漬し、次に、400倍希釈のビオチン化抗ウサギIgGヤギ抗体（Vector, CA）を含む0.02 M PBS（pH 7.4）に90分間浸漬した。0.02 M PBS（pH 7.4）で切片を洗浄後、100倍希釈のavidin-biotin-peroxidase complex（ABC, Vector, CA）を含む 0.02 M PBS（pH 7.4）に60分間浸漬した。さらに0.02 M PBS（pH 7.4）で切片を洗浄後、0.04% diaminobenzodine、0.06% 過酸化水素と0.08% 硫酸ニッケルアンモニウムを含む0.1 M PB（pH 7.4）で反応した。

実験2でBDAを注入した動物の切片は、0.02 M PBS（pH 7.4）で洗浄後、100倍希釈のABCを含む0.02 M PBS（pH 7.4）に60分間浸漬した。0.02 M PBS（pH 7.4）で切片を洗浄後、0.04% diaminobenzodine、0.06% 過酸化水素と0.08% 硫酸ニッケルアンモニウムを含む0.1 M PB（pH 7.4）で反応した。

実験3ではストレス群、コントロール群ともに、まず以下の2反応（① 、②）のいずれかを行なった。

① 3% NGSを含む0.02 M PBS（pH 7.4）に30分間浸漬後、3% NGS、0.2% Triton-Xと1,750倍希釈の抗c-Fosウサギ抗体を含む0.02 M PBS（pH 7.4）に一晩浸漬した。その後、0.02 M PBSで切片を洗浄後、3% NGSに60分間浸漬し、次に、400倍希釈のビオチン化抗ウサギIgGヤギ抗体を含む0.02 M PBS（pH 7.4）に60分間浸漬した。0.02 M PBS（pH 7.4）で切片を洗浄後、100倍希釈のABCを含む0.02 M PBS（pH 7.4）に60分間浸漬した。さらに0.02 M PBS（pH 7.4）で切片を洗浄後、0.04% diaminobenzodine、0.06% 過酸化水素と0.08% 硫酸ニッケルアンモニウムを含む0.1 M PB（pH 7.4）で反応した。

② 3% ウマ血清（NHS）を含む0.02 M PBS（pH 7.4）に30分間浸漬後、3% NHS、0.2% Triton-Xと1,750倍希釈の抗c-Fosヤギ抗体（Chemicon, CA）を含む0.02 M PBS（pH 7.4）に一晩浸漬した。

その後、0.02 M PBSで切片を洗浄後、3% NHSに60分間浸漬し、次に、400倍希釈のビオチン化抗ヤギIgGウマ抗体（Vector, CA）を含む0.02 M PBS（pH 7.4）に60分間浸漬した。0.02 M PBS（pH 7.4）で切片を洗浄後、100倍希釈のABCを含む0.02 M PBS（pH 7.4）に60分間浸漬した。さらに0.02 M PBS（pH 7.4）で切片を洗浄後、0.04% diaminobenzodine、0.06% 過酸化水素と0.08% 硫酸ニッケルアンモニウムを含む0.1 M PB（pH 7.4）で反応した。

①または②の終了後、3% ヤギ血清（NGS）を含む0.02 M PBS（pH 7.4）に30分間浸漬後、3% NGS、0.2% Triton-Xと10,000倍希釈の抗FGウサギ抗体（Chemicon, CA）を含む0.02 M PBS（pH 7.4）に一晩浸漬した。その後、0.02 M PBSで切片を洗浄後、3% NGSに30分間浸漬し、次に、400倍希釈のビオチン化抗ウサギIgGヤギ抗体（Vector, CA）を含む0.02 M PBS（pH 7.4）に60分間浸漬した。0.02 M PBS（pH 7.4）で切片を洗浄後、100倍希釈のABCを含む0.02 M PBS（pH 7.4）に60分間浸漬した。さらに0.02 M PBS（pH 7.4）で切片を洗浄後、0.04% diaminobenzodineと0.06% 過酸化水素を含む0.1 M PB（pH 7.4）で反応した。

上記実験1、2、3のすべての反応が終了した切片を、ゼラチンで被覆したスライドガラスに貼り付け乾燥させた。このうち、FG注入を行った動物の2セットの切片のうちの1セットとBDA注入を行った動物の3セットの切片のうちの2セットは、Neutral redまたはthionineを用いてNissl染色した。すべての切片はアルコールにて脱水後、キシレンを用いて透徹し、カバーガラスをかけた。

切片は明視野照明顕微鏡（Olympus BX 50, Japan）および蛍光顕微鏡（Nikon Eclipse 80i, Japan）を用いて観察した。FGの注入部位を、無反応、無染色の切片で、蛍光顕微鏡下でデジタルカメラ（Olympus Camedia C-7070, Japan）を用いて写真撮影した。Nissl染色されたニューロン、FG標識されたニューロン、c-Fos陽性のニューロン、c-Fos陽性でFG標識されたニューロン（double labeled neuron）、BDAで標識された軸索終末は、顕微鏡下で、描画装置（Olympus, Japan）を用いてトレースし、またデジタルカメラ（Pixera Pro 150ES, CA, USA）を用いて写真撮影した。3セットに分けられたうちの1セットを選択し、その中の切片で観察されたすべてのLHb部位

に認められたFG標識されたLHbニューロンとc-Fos陽性のLHbニューロン、double labeled LHb neuronの数をトレース上で数えた。撮影した写真はPhotoshop CS5 (Adobe System, CA, USA) を用いて、コントラストの調整のみを行った。BDA標識されたLHbニューロンの軸索終末とNissl染色されたVmesニューロンの細胞体とのコンタクトの有無は、報告されている方法 (Brown and Fyffe, 1981; Yoshida et al., 2001, 2009) に従い、顕微鏡下で50倍の油浸対物レンズで両者間にギャップがあるか否かを観察して判断した。

［結果］

LHbの細胞構築による同定

thionineまたNeutral redで染色された切片を観察し、細胞構築学的にLHbを同定した（図1）。Hbは両側性に第三脳室の側壁を構成し、視床上部に位置していた。Hbは小型ニュ-ロンが密集している内側のMHbと大型神経細胞から成る外側のLHbに二分出来た。LHbはさらに、その最吻側端を除き、ニューロンが相対的に小さな内側亜核（LHbM）と大きな外側亜核（LHbL）に細分出来た。これらの結果はこれまでの報告（Li et al., 1993；Paxinos and Watson, 1998；Andres et al., 1999）とよく一致していた。

実験 1 ： FGのVmesへの注入で得られた標識ニューロンの分布

実験3でストレス負荷をかけたラットとそのコントロールとして用いたラットを合わせて、計7匹のラットで、注入されたFGの部位はVmesを含んでいた。代表例（case R604）の注入部位を図2に示した。この例では、注入部位は主にVmesの尾側部を含んでいた。他の例でもこの例と同様に、注入部位の一部はVmesの内側の青斑核または中心灰白質の外側端、外側の結合腕傍核内側端、腹側の網様体にも侵入していた。7例で得られたFG標識ニューロンの分布様態は近似していたので、代表例（case R604）の結果を図3、図4、図9 に示した（case R604は、後述する実験3のストレス負荷実験のストレス群の代表例でもある）。いずれの例でも、逆行性にFG標識されたニューロンはLHbに多数認められた。代表例のcase R604では、FG注入部位と同側のLHbに242個、対側のLHbに200個、両側合計で442個であり、LHbの最吻側端を除いて両側まとめてLHbLに238個、LHbMに194個であった（図4、図9）。また、他の一例（R829。この例は、後述する実験3のストレス負荷実験のコントロール群の代表例でもある）のLHb内に認められた分布も図11に示した。この例でFG標識されたLHbニューロンは、FG注入部位と同側のLHbに142個、対側のLHbに115個、両側合計で257個であり、LHbの最吻側端を除いて両側まとめてLHbLに130個、LHbMに124個であった。これら

の数はcase R604よりも少なかったが、各部位の細胞数の比率は良く似ていた。

FG標識ニューロンは、LHbの近傍の視床では、室傍核にも少数認められたが他の核（MHb、視床髄条、背内側核、背内側核間核、外側中心核、束傍核など）には認められなかった（図3）。視床下部の特に外側部にも多数の標識ニューロンが認められた。また多くの標識ニューロンが背側縫線核と大縫線核に、少数が正中縫線核、不確縫線核、淡蒼縫線核に認められたが、rostromedial tegmental nucleus（RMTg）には認められなかった。

実験 2 ： BDAのLHbへの注入で得られた標識軸索および終末の分布

4匹のラットで、注入されたBDAの部位はLHbを含んでいた。代表例（case R030）の注入部位を図5に示した。この例では、注入部位はLHb内に限局し、特にLHbLを含んでいた。他の例では、注入部位の一部は、LHbMまたはLHbに接する視床の背内側核、外側中心核、反屈束、MHbに侵入していた。Vmesニューロンの細胞体が存在する中脳と橋の吻側レベルの脳幹で、順行性にBDAで標識された軸索とその終末の分布を調べた。4例で得られたBDA標識の分布は近似していたので、代表例（case R030）の結果を図6、図7 に示した。標識軸索と終末は、注入部位に対しやや同側優位の両側性に、脳幹の正中線寄りにより多く、外側部ほど少数認められた（図6）。Vmesの吻尾的全レベルで標識が認められた。Vmes核内では、対比染色されたVmesニューロンの細胞体の近傍に少数の軸索が走行し、細胞体とのコンタクトも認められた（図7）。

RMTgに最も密集した標識軸索と終末が認められた。中脳水道周囲灰白質の腹側部、中心灰白質、背側縫線核の特に吻側レベル、正中縫線核、橋網様被蓋核の内側部、背内側被蓋野に多数認められた。青斑核、結合腕傍核内側部にも少数認められた。しかしながら、大縫線核、淡蒼縫線核、不確縫線核には標識はほとんど認められなかった。

実験 3 ： ストレス負荷で賦活化された c-Fos陽性ニューロンの分布

ストレス群のラット4匹のc-Fos陽性ニューロンの分布様態は近似していたので、その代表例

（case R604）の分布を図8と図9に示した。この例では、陽性ニューロンは、両側性にLHb全体に広がって多数存在した。両側まとめてLHbLに433個、LHbMに842個であった。

c-Fos陽性ニューロンはMHb、視床髄条にはほとんど認められなかった。LHbの近傍では、両側性に、背側視床の室傍核と背内側核間核には多数認められたが、背内側核と外側中心核、束傍核には少数認められただけであった。さらに、RMTgにも認められたが、その吻側部に少数のみであった。縫線核群（背側縫線核、正中縫線核、大縫線核、淡蒼縫線核、不確縫線核）にも少数認められた。

コントロール群のラット4匹では、c-Fos陽性ニューロンの分布様態は近似していたので、その代表例（case R829）を図11に示した。LHb内には、両側性に少数個のみ認められた。両側まとめてLHbLに1個、LHbMに35個であり、ストレス群と比較して極めて少数であった。

LHbの近傍では、両側性に、背側視床の室傍核と背内側核間核には多数のc-Fos陽性ニューロンが認められたが、背内側核と外側中心核、束傍核には認められなかった。また、背側縫線核と淡蒼縫線核には少数認められたが、RMTgと正中縫線核、大縫線核、不確縫線核には認められなかった。

VmesへのFG注入によってFG標識されたニューロンで、c-Fos陽性のもの（double-labeled neuron）の分布

ストレス群とコントロール群すべてで、上記の実験1と同様にFGのVmesへの注入を行った。これらのうち、ストレス群2 匹とコントロール群2匹のFG注入部位は、上記の実験1の注入と同様にVmesの尾側部を含んでいた。これらのFG標識ニューロンの分布は、実験1の結果に含めて上記した。

ストレス群2匹とコントロール群2匹において、double-labeled neuronが認められた（図10）。ストレス群の代表例（case R604）のdouble-labeled neuronの分布を図9に示した。この例でのdouble-labeled neuronの数は、FG注入部位と同側のLHbに32個、対側のLHbに31個、両側合計で63個であり、LHbの最吻側端を除いて両側まとめてLHbLに29個、LHbMに34個であった。総数の63

個は、FG標識された全LHbニューロン数（442個）の14.3%であった。他の1 例（case R219）のdouble-labeled neuronの総数は79個で、FG標識された全LHbニューロン数560個の14.1%であった。2例の平均は14.2%であった。

これに対しコントロール群では、極めて少数のdouble-labeled neuronがLHbに認められた。コントロール群の代表例（case R829）のdouble-labeled neuronの分布を図11に示した。この例でのdouble-labeled neuronの数は、FG注入部位と同側のLHbに1個、対側のLHbに1個、両側合計で2個であり、LHbの最吻側端を除いて両側まとめてLHbLに0個、LHbMに2個であった。総数の2個は、FG標識された全LHbニューロン数（257個）の0.78%であった。他の1例（case R919）のdouble-labeled neuronの総数は1個で、FG標識された全LHbニューロン数251個の0.39%であった。2例の平均は0.59%であり、ストレス群と比較して極めて低い値であった。この結果は、VmesへのFG注入で標識されたLHbニューロンには、ストレス負荷によってc-fosを同時に発現する（ストレス負荷によって賦活化される）ニューロンが存在することを示している。

［考察］

本研究から、LHbからVmesへの直接投射の存在が明らかとなり、またLHbからVmesへの、縫線核またはRMTgを介した間接投射が存在することが示唆された。図12にLHbからVmesへのこれらの投射経路をまとめた。

LHbからのVmesへの投射について

直接投射:本研究によって、LHbから両側のVmesへの直接投射の存在が初めて明らかになった。これまでに、LHbはRMTg（Herkenham and Nauta, 1979; Jhou et al., 2009; Kaufling et al., 2009）と、縫線核、黒質、ventral tegmental area（Herkenham and Nauta, 1979）、the nucleus incertus（Goto et al., 2001; Olucha-Bordonau et al., 2003）に投射することが明らかになっていたが、Vmesへの投射は見つけられてはいなかった。一方、本研究ではVmesに投射するニューロンはMHbには認められなかったが、MHbはほぼ脚間核のみに投射するというこれまでの報告(Herkenham and Nauta, 1979）を支持している。

LHbの中にはGABA作動性のニューロンは少なく、この核からの下行投射はグルタミン酸作動性であることが示されている（Geisler and Trimble, 2008; Brinschwitz et al., 2010; Aizawa et al., 2012）ので、本研究で明らかになったVmesへの投射もグルタミン酸作動性である可能性が高い。Vmesニューロンの細胞体にはグルタミン酸レセプターであるAMPAレセプター、KAレセプター、NMDAレセプターが存在し（Pelkey and Marshall, 1998; Mineff et al., 1998; Turman et al., 1999, 2000, 2001）、Vmesニューロンの細胞体とシナプスを形成する前ニューロンの軸索終末にグルタミン酸を含むものが存在することが明らかになっている（Kaneko et al., 1989; Lazalov, 2002； Paik et al., 2012）。さらに、in vitroの単一細胞内記録実験で、グルタミン酸投与によってVmesニューロンの細胞体から活動電位が記録されている（Pelkey and Marshall, 1998）。LHbからのグルタミン酸作動性の直接投射によって、Vmesニューロンの細胞体が興奮させられている可能性が考えられる。

間接投射：本研究では、Vmesに投射する多くのニューロンが背側縫線核と大縫線核に認められた。正中縫線核、不確縫線核、淡蒼縫線核には少数のニューロンが認められたのみであった。背側縫線核と正中縫線核ニューロンのVmesへの投射は既に多くの報告（Tashiro et al., 1989; Copray et al., 1990b, 1991; Lazarov and Chouchkov, 1995）がある。

背側縫線核や正中縫線核を含む縫線核群はセロトニン作動性ニューロンを多く含んでいるので、背側縫線核や正中縫線核からVmesへの投射もセロトニン作動性ニューロンと考えられる。Vmesニューロンの細胞体にはセロトニンの受容体が存在し（Copray et al., 1990a,b; Lazarov, 2000, 2007; Li et al., 2000）、in-vitro脳幹slice切片で、セロトニンはVmesニューロンの細胞体の静止膜電位を過分極させること（Lazarov, 2000, 2002; Li et al., 2000；Tanaka and Chandler, 2006）が報告されている。

なお、三叉神経運動核内に存在する閉口筋運動ニューロンは、Vmesニューロンからの直接性の強力な興奮性入力を受けている（Shigenaga et al., 1988b）。この閉口筋運動ニューロンと、同様に三叉神経運動核内に存在する開口筋運動ニューロンの細胞体と樹状突起上にセロトニン作動性ニューロンからの入力が有り、両運動ニューロンに対して興奮性に働いていることが知られている（Katakura and Chandler, 1990; Kurasawa et al., 1990; Nagase et al., 1997）。しかし、これらの興奮性入力は、主に淡蒼縫線核と不確縫線核からのものである（Fritschy et al., 1988; Fort et al., 1990; Li et al., 1993b; Nagase et al., 1997）。本研究で、LHbは淡蒼縫線核と不確縫線核にはほとんど投射しなかったので、この両運動ニューロンに対する興奮性の亢進にはLHbは関与しないと考えられる。

本研究で、LHbから背側縫線核、正中縫線核への投射（Herkenham and Nauta, 1977; Aghajanian and Wang, 1977; Araki et al., 1988; Sego et al., 2014）が確認された。よって、LHbからVmesへ、背側縫線核、正中縫線核を経由した間接投射が存在することを示唆している。背側縫線核、正中縫線核は多くのセロトニン作動性ニューロンを含む（Aghajanian and Gallager, 1975）。上記の様に、LHbからの直接投射はグルタミン酸作動性の興奮性と考えられる（Geisler

and Trimble, 2008; Brinschwitz et al., 2010; Aizawa et al., 2012）ので、LHbニューロンの活動によって両縫線核のセロトニン作動性ニューロンが賦活され、Vmesニューロンの細胞体が抑制性の入力を受けると考えられる。また本研究では、LHbからRMTgへの強い投射（Jhou et al., 2009b; Sego et al., 2014）が確認された。RMTgはGABA作動性の投射ニューロンを含み、背側縫線核、正中縫線核にも投射することが明らかになり、現在注目されている（Jhou et al., 2009a,b; Sego et al., 2014）。この発見は、LHbからVmesへ、RMTg-背側縫線核またはRMTg-正中縫線核を経由したより複雑な間接投射が存在することを示唆している。LHbニューロンの活動によって、RMTgのGABA作動性の抑制性の投射が賦活され、両縫線核からVmesニューロンの細胞体へのセロトニン作動性の抑制性の入力が抑制されると考えられる。Vmesニューロンの細胞体は脱抑制されることになる。なお、本研究で、Vmesに投射するRMTgニューロンは標識されなかったので、LHb-RMTg-Vmesの経路は無い様にみえる。

LHbからVmesへの投射のストレスへの関与

うつ病の有病率は人口の5-8%と極めて高い。その病因の一つとして、何らかの遺伝子要因を持つ者に、心因、身体因としてのストレス負荷が契機となって脳内モノアミン（セロトニン、ノルアドレナリンなど）代謝障害が惹起されることが指摘されている（山脇成人、2005）。動物に持続的な強いストレス負荷をかけることでうつ状態の動物を作ることも出来る。うつ状態は、基本的には全身的な機能の活性が抑制されている。よって、Vmesニューロンが関わる頭頸部の機能も影響（抑制）を受けると考えられるが、それに関わる脳内神経機構は全くわかっていない。一方、ストレス負荷時にLHbニューロンが活性化されることは良く知られている（Caldecott Hazard et al., 1988; Morris et al., 1999; Amat et al., 2001; Shumake et al., 2003; Sartorius et al.,2010; Li et al., 2011; Meng et al., 2011）。そこで、本研究で明らかになったLHbからVmesへの直接投射がストレス負荷時に働いていることと、本研究で示唆された LHbからVmesへの2種の間接投射が働く可能性を、活性化された細胞の指標になっているc-Fos陽性ニューロンを検

索して調べた。

ストレスが体内の各種機能におよぼす影響を調べる実験では、様々なストレス負荷が用いられてきた。本研究で対象となったVmesニューロンは、三叉神経運動核および脳幹に存在する他の運動核に投射する運動前ニューロンを含む三叉神経上核，三叉神経吻側亜核と主感覚核，外側網様体に投射して顎運動を含む頭部の運動に関わり、さらに頸髄にまで下行して頸筋の制御にも関わっている（Shigenaga et al., 1989; Luo et al., 1995; Luo et al., 2006; Satoda et al., 2002）。このうちの顎運動は、咀嚼や嚥下ばかりでなく、呼吸、会話、構音、さらには、道具や武器としての働きもある。この様に多様な機能を持つVmesニューロンに対するストレスの関与を検討するためには、用いられるストレスは全身性で一般的な不快刺激や不快情報であるべきと考えられる。そこで、本研究では全身性の物理的ストレスとして一般的に用いられている拘束ストレスを採用した。拘束ストレスは、比較的高いストレス強度を持った物理的ストレスとみなされている。拘束ストレスには、本研究で用いた四肢をテープで固定する方法（Chowdhury et al., 2000; Sato et al., 2010）や、動物を狭い袋や筒に閉じ込める方法があり（Goebel et al., 2009; Lino-de-Oliveira, 2001）、どちらもよく用いられている。

拘束ストレスによってLHbニューロンの活動が亢進されることが、c-Fos陽性ニューロンの検索によって、本研究で初めて明らかにされた。ただし、他のストレス負荷による亢進は既に報告されており、歯髄の電気刺激や足の皮膚に与えた急性侵害性電気刺激でc-Fos陽性ニューロンが増加する（Matsumoto et al., 1994; Lehner et al., 2004）。また、LHbニューロンは非侵害性刺激には応答しないことも示されている（Benabid and Jeaugey, 1989）。動物が好む食餌を与えた時に、LHbのc-Fos陽性ニューロンが減少することも報告されている（Park and Carr, 1998）。

本研究では、Vmesに直接投射し、かつc-Fos陽性のLHbニューロン（double-labeled neuron）は存在したが、Vmesに直接投射するLHbニューロン全体に対する比率は高くなかった。Franklin and Druhan（2000）は、FGは神経細胞毒なので、それを逆行性に取り込んだ細胞は活性が低下してしまい、FG標識されたc-Fos陽性ニューロンの数は減ると指摘している。本研究で示された

double labeled neuronは、実際には本研究結果よりも多い可能性がある。いずれにせよ本研究結果から、LHb-Vmesの直接路がストレス時に活動していることは確かである。

このように、ストレスで賦活されるVmesに投射するLHbニューロンの数は本研究結果では過小評価されている可能性はあるが、賦活されたLHbニューロンは極めて多く存在した。本研究で示唆された背側縫線核または正中縫線核に投射するLHbニューロン、背側縫線核または正中縫線核に投射するRMTgニューロンに投射するLHbニューロンも、本ストレス負荷で活性化されている可能性が考えられる。縫線核はセロトニン作動性ニューロンを多く含み、脳内で広汎に投射している（Aghajanian and Gallager, 1975）。セロトニンの枯渇がうつ病の発症に関わっていることが提唱されている（Takase et al., 2004）。また、LHbの電気刺激は縫線核からのセロトニンの放出を抑制している（Stern et al., 1979; Nishikawa and Scatton, 1985）（抑制のみではなく一部促通効果もある、との報告もある［Kalen et al., 1989］）。つまり、ストレス負荷で活性化されたLHbニューロンが、背側縫線核や正中縫線核に直接投射またはRMTgを介して両縫線核に間接投射し、セロトニン作動性ニューロンを抑制していることが考えられる。しかしながら、上記のようにLHbからの投射はグルタミン酸作動性で興奮性と考えられるので、その直接投射によって背側縫線核や正中縫線核のセロトニン作動性のニューロンを抑制することは考え難い。本研究でも明らかにしたようにLHbから背側縫線核や正中縫線核への投射が有ることは確かなので、未だ知られていないセロトニン作動性のニューロンの抑制機構があるのかもしれない。もしその様な抑制機構は存在しないのであれば、背側縫線核や正中縫線核のセロトニン作動性のニューロンは興奮し、本研究でも明らかになったVmesへの投射が賦活され、最終的にVmesニューロンの細胞体は抑制されることになる。どちらの可能性が正しいのかは、今後の研究を待たねばならない。

本研究でも明らかになったLHbからのグルタミン酸作動性の投射を受けるRMTgは、上記の様に、GABA作動性ニューロンを多く含み、背側縫線核や正中縫線核への投射ニューロンもGABA作動性であることが近年明らかになった（Jhou et al., 2009a,b; Sego et al., 2014）。ストレス負荷で活性化されたLHbニューロンがRMTgを興奮させ、興奮させられたRMTgニューロンがセロトニン

作動性の背側縫線核や正中縫線核ニューロンを抑制することが考えられる。この経路であるならば、上記の、LHb の電気刺激が縫線核からのセロトニンの放出を抑制すること（Stern et al., 1979; Nishikawa and Scatton, 1985）は可能になる。縫線核からVmesへの投射は上記の様に抑制性なので、RMTg-縫線核-Vmes路によってVmesニュ-ロンの細胞体は最終的に脱抑制されることになる。この経路によるVmesニューロンの細胞体への効果は、上記のLHbからVmesニューロンの細胞体への直接投射が興奮性であることと一致する。

本研究によって、咀嚼筋および歯根膜感覚を伝達し頭頸部の運動の制御に関わっているVmesニューロンの細胞体がLHbニューロンからの投射を受け、LHbニューロンによって興奮（または抑制）されることが示唆された。また、この興奮（または抑制）が、ストレス等の不快刺激が与えられた時に発現していることが示唆された。しかしながら残念なことに、偽単極性のVmesニューロンの細胞体の興奮（または抑制）が、Vmesニューロン全体の情報の伝播にどのような影響を与えるのかは未だ良くわかっていないので、本研究で示されたLHbニューロンによるVmesニューロンへの影響も現時点では多くが不明である。今後更なる研究が必要と考えられる。

［結論］

本研究によって、LHbからVmesへの直接投射の存在が明らかになった。この投射は、拘束ストレス負荷時に働くことが明らかになった。また、LHbからVmesへの、縫線核またはRMTgを介した間接投射が存在することが示唆された。顎運動を含む頭頸部の運動の制御に、ストレスがLHbからVmesへの投射路を介して影響を与えている可能性が示された。

[参考文献]

Aghajanian GK, Gallager DW (1975) Raphe origin of serotonergic nerves terminating in the cerebral ventricles. Brain Res 88:221-231.

Aghajanian GK, Wang RY (1977) Habenular and other midbrain raphe afferents demonstrated by a modified retrograde tracing technique. Brain Res 122:229-242.

Aizawa H, Kobayashi M, Tanaka S, Fukai T, Okamoto H (2012) Molecular characterization of the subnuclei in rat habenula. J Comp Neurol 520:4051-4066.

Amat J, Sparks PD, Matus-Amat P, Griggs J, Watkins LR, Maier SF (2001) The role of the habenular complex in the elevation of dorsal raphe nucleus serotonin and the changes in the behavioral responses produced by uncontrollable stress. Brain Res 917:118-126.

Andres KH, von Düring M, Veh RW (1999) Subnuclear organization of the rat habenular complexes. J Comp Neurol 407:130-150.

Araki M, McGeer PL, Kimura H (1988) The efferent projections of the rat lateral habenular nucleus revealed by the PHA-L anterograde tracing method. Brain Res 441:319-330.

Benabid AL, Jeaugey L (1989) Cells of the rat lateral habenula respond to high-threshold somatosensory inputs. Neurosci Lett 96:289-294.

Brinschwitz K, Dittgen A, Madai VI, Lommel R, Geisler S, Veh RW (2010) Glutamatergic axons from the lateral habenula mainly terminate on GABAergic neurons of the ventral midbrain. Neuroscience 168:463-476.

Brown AG, Fyffe RE (1981) Direct observations on the contacts made between Ia afferent fibres and alpha-motoneurones in the cat's lumbosacral spinal cord. J Physiol 313:121-140.

Caldecott-Hazard S, Mazziotta J, Phelps M (1988) Cerebral correlates of depressed behavior in rats, visualized using 14C-2-deoxyglucose autoradiography. J Neurosci 8:1951-1961.

Capra NF, Wax TD (1989) Distribution and central projections of primary afferent neurons that innervate the masseter muscle and mandibular periodontium: a double-label study. J Comp Neurol 279:341-352.

Carpenter MB, (1991) Core text of neuroanatomy, 4th ed. Baltimore: Williams and Wikins.

Chowdhury GM, Fujioka T, Nakamura S (2000) Induction and adaptation of Fos expression in the rat brain by two types of acute restraint stress. Brain Res Bull 52:171-182.

Copray JC, Liem RS, Ter Horst GJ, van Willigen JD (1990a) Dopaminergic afferents to the mesencephalic trigeminal nucleus of the rat: a light and electron microscope immunocytochemistry study. Brain Res 514:343-348.

Copray JC, Liem RS, Ter Horst GJ, van Willigen JD (1991) Origin, distribution and morphology of serotonergic afferents to the mesencephalic trigeminal nucleus of the rat. Neurosci Lett 121:97-101.

Copray JC, Ter Horst GJ, Liem RS, van Willigen JD (1990b) Neurotransmitters and neuropeptides within the mesencephalic trigeminal nucleus of the rat: an immunohistochemical analysis. Neuroscience 37:399-411.

Corbin KB (1940) Observations on the peripheral distribution of fibers arising in the mesencephalic nucleus of the fifth cranial nerve. J Comp Neurol 73:153-177.

Dessem D, Luo P (1999) Jaw-muscle spindle afferent feedback to the cervical spinal cord in the rat. Exp Brain Res 128:451-459.

Fort P, Luppi PH, Sakai K, Salvert D, Jouvet M (1990) Nuclei of origin of monoaminergic, peptidergic, and cholinergic afferents to the cat trigeminal motor nucleus: a double-labeling study with cholera-toxin as a retrograde tracer. J Comp Neurol 301:262-275.

Franklin TR, Druhan JP (2000) The retrograde tracer fluoro-gold interferes with the expression of fos-related antigens. J Neurosci Methods 98:1-8.

Freeman W (1925) The relationship of the radix mesencephalica trigemini to the extraocular muscles. Arch Neurol Psychiatry 14:111-113.

Fritschy JM, Lyons WE, Molliver ME, Grzanna R (1988) Neurotoxic effects of p-chloroamphetamine on the serotoninergic innervation of the trigeminal motor nucleus: a retrograde transport study. Brain Res 473:261-270.

Geisler S, Trimble M (2008) The lateral habenula: no longer neglected. CNS Spectr 13:484-489.

Goebel M, Stengel A, Wang L, Taché Y (2009) Restraint stress activates nesfatin-1-immunoreactive brain nuclei in rats. Brain Res 1300:114-124.

Goto M, Swanson LW, Canteras NS (2001) Connections of the nucleus incertus. J Comp Neurol 438:86-122.

Herkenham M, Nauta WJ (1977) Afferent connections of the habenular nuclei in the rat. A horseradish peroxidase study, with a note on the fiber-of-passage problem. J Comp Neurol 173:123-146.

Herkenham M, Nauta WJ (1979) Efferent connections of the habenular nuclei in the rat. J Comp Neurol 187:19-47.

Hikosaka O (2010) The habenula: from stress evasion to value-based decision-making. Nat Rev Neurosci 11:503-513.

Honma S, Moritani M, Zhang LF, Lu LQ, Yoshida A, Appenteng K, Shigenaga Y (2001) Quantitative ultrastructure of synapses on functionally identified primary afferent neurons in the cat trigeminal mesencephalic nucleus. Exp Brain Res 137:150-162.

Iida C, Oka A, Moritani M, Kato T, Haque T, Sato F, Nakamura M, Uchino K, Seki S, Bae YC, Takada K, Yoshida A (2010) Corticofugal direct projections to primary afferent neurons in the trigeminal mesencephalic nucleus of rats. Neuroscience 169:1739-1757.

JH Z, S S, FR M, ChaseMH (2004) Distribution of hypocretin (orexin) immunoreactivity in the feline pons and medulla. Brain Res 995:205-217.

Jhou TC, Fields HL, Baxter MG, Saper CB, Holland PC (2009a) The rostromedial tegmental nucleus (RMTg), a GABAergic afferent to midbrain dopamine neurons, encodes aversive stimuli and inhibits motor responses. Neuron 61:786-800.

Jhou TC, Geisler S, Marinelli M, Degarmo BA, Zahm DS (2009b) The mesopontine rostromedial tegmental nucleus: A structure targeted by the lateral habenula that projects to the ventral tegmental area of Tsai and substantia nigra compacta. J Comp Neurol 513:566-596.

Johnston JB (1909) The radix mesencephalica trigemini. Journal of Comparative Neurology and Psychology 19:593-644.

Jones EG (2007) The Thalamus Second Edition. Cambridge University Press, Cambridge.

Kalén P, Lindvall O, Björklund A (1989) Electrical stimulation of the lateral habenula increases hippocampal noradrenaline release as monitored by in vivo microdialysis. Exp Brain Res 76:239-245.

Kaneko T, Itoh K, Shigemoto R, Mizuno N (1989) Glutaminase-like immunoreactivity in the lower brainstem and cerebellum of the adult rat. Neuroscience 32:79-98.

Katakura N, Chandler SH (1990) An iontophoretic analysis of the pharmacologic mechanisms responsible for trigeminal motoneuronal discharge during masticatory-like activity in the guinea pig. J Neurophysiol 63:356-369.

Kaufling J, Veinante P, Pawlowski SA, Freund-Mercier MJ, Barrot M (2009) Afferents to the GABAergic tail of the ventral tegmental area in the rat. J Comp Neurol 513:597-621.

Kurasawa I, Toda K, Nakamura Y (1990) Non-reciprocal facilitation of trigeminal motoneurons innervating jaw-closing and jaw-opening muscles induced by iontophoretic application of serotonin in the guinea pig. Brain Res 515:126-134.

Lazarov NE (2000) The mesencephalic trigeminal nucleus in the cat. Adv Anat Embryol Cell Biol 153:iii-xiv, 1-103.

Lazarov NE (2002) Comparative analysis of the chemical neuroanatomy of the mammalian trigeminal ganglion and mesencephalic trigeminal nucleus. Prog Neurobiol 66:19-59.

Lazarov NE (2007) Neurobiology of orofacial proprioception. Brain Res Rev 56:362-383.

Lazarov NE, Chouchkov CN (1995) Immunocytochemical localization of tyrosine hydroxylase and gamma-aminobutyric acid in the mesencephalic trigeminal nucleus of the cat: a light and electron microscopic study. Anat Rec 242:123-131.

Lazarov NE, Usunoff KG, Schmitt O, Itzev DE, Rolfs A, Wree A (2011) Amygdalotrigeminal projection in the rat: An anterograde tracing study. Ann Anat 193:118-126.

Lehner M, Taracha E, Skórzewska A, Wisł owska A, Zienowicz M, Maciejak P, Szyndler J, Bidziń ski A, Pł aź nik A (2004) Sensitivity to pain and c-Fos expression in brain structures in rats. Neurosci Lett 370:74-79.

Li B, Piriz J, Mirrione M, Chung C, Proulx CD, Schulz D, Henn F, Malinow R (2011) Synaptic potentiation onto habenula neurons in the learned helplessness model of depression. Nature 470:535-539.

Li J, Xiong KH, Li YQ, Kaneko T, Mizuno N (2000) Serotonergic innervation of mesencephalic trigeminal nucleus neurons: a light and electron microscopic study in the rat. Neurosci Res 37:127-140.

Li YQ, Takada M, Mizuno N (1993a) Demonstration of habenular neurons which receive afferent fibers from the nucleus accumbens and send their axons to the midbrain periaqueductal gray. Neurosci Lett 158:55-58.

Li YQ, Takada M, Mizuno N (1993b) The sites of origin of serotoninergic afferent fibers in the trigeminal motor, facial, and hypoglossal nuclei in the rat. Neurosci Res 17:307-313.

Liem RS, Copray JC, van Willigen JD (1992) Distribution of synaptic boutons in the mesencephalic trigeminal nucleus of the rat--a quantitative electron-microscopical study. Acta Anat (Basel) 143:74-78.

Lino-de-Oliveira C, Sales AJ, Del Bel EA, Silveira MC, Guimarães FS (2001) Effects of acute and chronic fluoxetine treatments on restraint stress-induced Fos expression. Brain Res Bull 55:747-754.

Luo P, Dessem D (1995) Inputs from identified jaw-muscle spindle afferents to trigeminothalamic neurons in the rat: a double-labeling study using retrograde HRP and intracellular biotinamide. J Comp Neurol 353:50-66.

Luo P, Zhang J, Yang R, Pendlebury W (2006) Neuronal circuitry and synaptic organization of trigeminal proprioceptive afferents mediating tongue movement and jaw-tongue coordination via hypoglossal premotor neurons. Eur J Neurosci 23:3269-3283.

Luo P, Li JS (1991) Monosynaptic connections between neurons of trigeminal mesencephalic nucleus and jaw-closing motoneurons in the rat: an intracellular horseradish peroxidase labelling study. Brain Res 559:267-275.

Luo P, Wang BR, Peng ZZ, Li JS (1991) Morphological characteristics and terminating patterns of masseteric neurons of the mesencephalic trigeminal nucleus in the rat: an intracellular horseradish peroxidase labeling study. J Comp Neurol 303:286-299.

Matsumoto M, Hikosaka O (2007) Lateral habenula as a source of negative reward signals in dopamine neurons. Nature 447:1111-1115.

Matsumoto M, Hikosaka O (2009) Representation of negative motivational value in the primate lateral habenula. Nat Neurosci 12:77-84.

Matsumoto M, Hikosaka O (2011) Electrical stimulation of the primate lateral habenula suppresses saccadic eye movement through a learning mechanism. PLoS One 6:e26701.

Matsumoto N, Yahata F, Kawarada K, Kamata K, Suzuki TA (1994) Tooth pulp stimulation induces c-fos expression in the lateral habenular nucleus of the cat. Neuroreport 5:2397-2400.

Meng H, Wang Y, Huang M, Lin W, Wang S, Zhang B (2011) Chronic deep brain stimulation of the lateral habenula nucleus in a rat model of depression. Brain Res 1422:32-38.

Mineff EM, Popratiloff A, Usunoff KG, Marani E (1998) Immunocytochemical localization of the AMPA receptor subunits in the mesencephalic trigeminal nucleus of the rat. Arch Physiol Biochem 106:203-209.

Morris JS, Smith KA, Cowen PJ, Friston KJ, Dolan RJ (1999) Covariation of activity in habenula and dorsal raphé nuclei following tryptophan depletion. Neuroimage 10:163-172.

Nagase Y, Moritani M, Nakagawa S, Yoshida A, Takemura M, Zhang LF, Kida H, Shigenaga Y (1997) Serotonergic axonal contacts on identified cat trigeminal motoneurons and their correlation with medullary raphe nucleus stimulation. J Comp Neurol 384:443-455.

Nagy JI, Buss M, Daddona PE (1986) On the innervation of trigeminal mesencephalic primary afferent neurons by adenosine deaminase-containing projections from the hypothalamus in the rat. Neuroscience 17:141-156.

Nieuwenhuys R, Donkelaar HJ ten, Nicholson C. 1998. The central nervous system of vertebrates. Springer Berlin Heidelberg, New York.

Nishikawa T, Scatton B (1985) Inhibitory influence of GABA on central serotonergic transmission. Raphé nuclei as the neuroanatomical site of the GABAergic inhibition of cerebral serotonergic neurons. Brain Res 331:91-103.

Nomura S, Mizuno N (1985) Differential distribution of cell bodies and central axons of mesencephalic trigeminal nucleus neurons supplying the jaw-closing muscles and periodontal tissue: a transganglionic tracer study in the cat. Brain Res 359:311-319.

Olucha-Bordonau FE, Teruel V, Barcia-González J, Ruiz-Torner A, Valverde-Navarro AA, Martínez-Soriano F (2003) Cytoarchitecture and efferent projections of the nucleus incertus of the rat. J Comp Neurol 464:62-97.

Paik SK, Kwak MK, Bae JY, Yi HW, Yoshida A, Ahn DK, Bae YC (2012) γ-Aminobutyric acid-, glycine-, and glutamate-immunopositive boutons on mesencephalic trigeminal neurons that innervate jaw-closing muscle spindles in the rat: ultrastructure and development. J Comp Neurol 520:3414-3427.

Park TH, Carr KD (1998) Neuroanatomical patterns of fos-like immunoreactivity induced by a palatable meal and meal-paired environment in saline- and naltrexone-treated rats. Brain Res 805:169-180.

Paxinos G, Watson C (1998) The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. 4th ed. Sydney: Academic Press.

Pelkey KA, Marshall KC (1998) Actions of excitatory amino acids on mesencephalic trigeminal neurons. Can J Physiol Pharmacol 76:900-908.

Probst M (1899) Über vom Vierhügel, von der Brücke und vom Kleinhirn absteigende Bahnen - Springer. Deutsche Zeitschrift für Nervenheilkunde 15:192-221.

Sartorius A, Kiening KL, Kirsch P, von Gall CC, Haberkorn U, Unterberg AW, Henn FA, Meyer-Lindenberg A (2010) Remission of major depression under deep brain stimulation of the lateral habenula in a therapy-refractory patient. Biol Psychiatry 67:e9-e11.

Sato C, Sato S, Takashina H, Ishii H, Onozuka M, Sasaguri K (2010) Bruxism affects stress responses in stressed rats. Clin Oral Investig 14:153-160.

Satoda T, Matsumoto H, Zhou L, Rose PK, Richmond FJ (2002) Mesencephalic projections to the first cervical segment in the cat. Exp Brain Res 144:397-413.

Sego C, Gonçalves L, Lima L, Furigo IC, Donato J, Metzger M (2014) Lateral habenula and the rostromedial tegmental nucleus innervate neurochemically distinct subdivisions of the dorsal raphe nucleus in the rat. J Comp Neurol 522:1454-1484.

Shepard PD, Holcomb HH, Gold JM (2006) Schizophrenia in translation: the presence of absence: habenular regulation of dopamine neurons and the encoding of negative outcomes. Schizophr Bull 32:417-421.

Shigenaga Y, Mitsuhiro Y, Shirana Y, Tsuru H (1990) Two types of jaw-muscle spindle afferents in the cat as demonstrated by intra-axonal staining with HRP. Brain Res 514:219-237.

Shigenaga Y, Mitsuhiro Y, Yoshida A, Cao CQ, Tsuru H (1988a) Morphology of single mesencephalic trigeminal neurons innervating masseter muscle of the cat. Brain Res 445:392-399.

Shigenaga Y, Yoshida A, Tsuru K, Mitsuhiro Y, Otani K, Cao CQ (1988b) Physiological and morphological characteristics of cat masticatory motoneurons--intracellular injection of HRP. Brain Res 461:238-256.

Shigenaga Y, Sera M, Nishimori T, Suemune S, Nishimura M, Yoshida A, Tsuru K (1988c) The central projection of masticatory afferent fibers to the trigeminal sensory nuclear complex and upper cervical spinal cord. J Comp Neurol 268:489-507.

Shigenaga Y, Doe K, Suemune S, Mitsuhiro Y, Tsuru K, Otani K, Shirana Y, Hosoi M, Yoshida A, Kagawa K (1989) Physiological and morphological characteristics of periodontal mesencephalic trigeminal neurons in the cat--intra-axonal staining with HRP. Brain Res 505:91-110.

Shirasu M, Takahashi T, Yamamoto T, Itoh K, Sato S, Nakamura H (2011) Direct projections from the central amygdaloid nucleus to the mesencephalic trigeminal nucleus in rats. Brain Res 1400:19-30.

Shumake J, Gonzalez-Lima F (2003) Brain systems underlying susceptibility to helplessness and depression. Behav Cogn Neurosci Rev 2:198-221.

Stern WC, Johnson A, Bronzino JD, Morgane PJ (1979) Effects of electrical stimulation of the lateral habenula on single-unit activity of raphe neurons. Exp Neurol 65:326-342.

Swanson LW (1992) Brain Maps: Structure of the Rat Brain. Amsterdam, Elisevier Science.

Takahashi T, Shirasu M, Kubo KY, Onozuka M, Sato S, Itoh K, Nakamura H (2010) The locus coeruleus projects to the mesencephalic trigeminal nucleus in rats. Neurosci Res 68:103-106.

Tanaka S, Chandler SH (2006) Serotonergic modulation of persistent sodium currents and membrane excitability via cyclic AMP-protein kinase A cascade in mesencephalic V neurons. J Neurosci Res 83:1362-1372.

Tashiro T, Satoda T, Matsushima R, Mizuno N (1989) Enkephalin-, substance P- and serotonin-like immunoreactive axonal varicosities in close apposition to perikarya of mesencephalic trigeminal nucleus neurons in the cat. Brain Res 494:162-167.

Turman JE, Ajdari J, Chandler SH (1999) NMDA receptor NR1 and NR2A/B subunit expression in trigeminal neurons during early postnatal development. J Comp Neurol 409:237-249.

Turman JE, Hiyama L, Castillo M, Chandler SH (2001) Expression of group I and II metabotropic glutamate receptors in trigeminal neurons during postnatal development. Dev Neurosci 23:41-54.

Turman JE, MacDonald AS, Pawl KE, Bringas P, Chandler SH (2000) AMPA receptor subunit expression in trigeminal neurons during postnatal development. J Comp Neurol 427:109-123.

Ullsperger M, von Cramon DY (2003) Error monitoring using external feedback: specific roles of the habenular complex, the reward system, and the cingulate motor area revealed by functional magnetic resonance imaging. J Neurosci 23:4308-4314.

Yoshida A, Fukami H, Nagase Y, Appenteng K, Honma S, Zhang LF, Bae YC, Shigenaga Y (2001) Quantitative analysis of synaptic contacts made between functionally identified oralis neurons and trigeminal motoneurons in cats. J Neurosci 21:6298-6307.

Yoshida A, Taki I, Chang Z, Iida C, Haque T, Tomita A, Seki S, Yamamoto S, Masuda Y, Moritani M, Shigenaga Y (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.

Zhang J, Luo P (2002) Orexin B immunoreactive fibers and terminals innervate the sensory and motor neurons of jaw-elevator muscles in the rat. Synapse 44:106-110.

Zhang J, Luo P, Pendlebury WW (2001) Light and electron microscopic observations of a direct projection from mesencephalic trigeminal nucleus neurons to hypoglossal motoneurons in the rat. Brain Res 917:67-80.

Zhang J, Pendlebury WW, Luo P (2003) Synaptic organization of monosynaptic connections from mesencephalic trigeminal nucleus neurons to hypoglossal motoneurons in the rat. Synapse 49:157-169.

Zhang J, Yang R, Pendlebery W, Luo P (2005) Monosynaptic circuitry of trigeminal proprioceptive afferents coordinating jaw movement with visceral and laryngeal activities in rats. Neuroscience 135:497-505.

Zhang JH, Sampogna S, Morales FR, Chase MH (2004) Distribution of hypocretin (orexin) immunoreactivity in the feline pons and medulla. Brain Res 995:205-217.

山脇成人(2005)うつ病の脳科学的研究:最近の話題。129回日本医学会シンポジウム記録集

[図の説明]

図1

外側手綱核（lateral habenula、LHb）の細胞構築と亜核

thionine染色したLHbを含むの冠状断切片の顕微鏡写真。A：黒四角で囲まれた部位の拡大が（B）である。Aのスケール＝1 mm。Bのスケール＝0.2 mm。

図2

逆行性トレーサーであるFluorogold（FG）の三叉神経中脳路核（Vmes）への注入部位の蛍光顕微鏡写真

case R604のラットの冠状断切片。核の境界線は、この切片の隣の切片（thionine染色している）を参考にした。上が背側、左が外側。スケール＝0.2 mm。

図3

LHbを含むレベルに認められた逆行性に標識されたFG標識ニューロンの分布

本例（case R604）のFG注入部位は図2に示した。A, B：LHbの吻側レベルと尾側レベルを含む冠状断切片で、左側がFG注入部位と同側。赤丸が視床と視床下部に認められたFG標識ニューロン。Bのスケール＝1 mm（Aにも適用）。

図4

LHbに認められたFG標識細胞の分布

A-G：LHbを含む7個のレベルの冠状断切片で、吻尾的に並べた。本例（case R604）のFG注入部位は図2に示した。各パネルの左側がFG注入部位と同側。赤丸がFG標識ニューロン。本図で示されたFG標識ニューロンの分布は図9でも示されている。Gのスケール＝0.2 mm（A-Fにも適用）。

図5

順行性トレーサーであるbiotinylated dextranamine（BDA）のLHbへの注入部位

case R030で得た結果。A-C：それぞれ、注入部位の吻側、中央、尾側レベルの冠状断切片のトレース。D：注入部位の中央レベル（B）の顕微鏡写真。切片はNeutral redで染色している。Cのスケール＝1 mm（A、Bにも適用）。Dのスケール＝0.2 mm。

図6

LHbからVmesを含む中脳と橋への投射の様態

A-E：Vmesが存在する中脳と橋の5レベルの冠状断切片を吻尾的に並べている。順行性にBDA標識された軸索をトレースしている。本例（case R030）のLHbへのBDA注入部位は図5に示した。各パネルの左側がBDA注入部位と同側。Eのスケール＝1 mm（A-Dにも適用）。

図7

Vmesニューロンの細胞体にコンタクトするBDA標識軸索終末

本例（case R030）のLHbへのBDA注入部位は図5に示した。FG注入部位と同側のVmes内に認められた順行性にBDA標識された軸索と終末をトレースしている。各パネルの左側が外側、上が背側。Neutral redで赤染されたVmesニューロンの細胞体にコンタクトするBDA標識軸索終末を矢頭で指示している。（A）および（C）中のコンタクトの顕微鏡写真が、それぞれ（B）と（D）である。Cのスケール＝20 μm（Aにも適用）。Dのスケール＝20 μm（Bにも適用）。

図8

拘束ストレスを与えた（ストレス群）ラットで、LHbに認められたc-Fos陽性ニューロンの分布

case R604で得た結果。A-G：LHbが存在する7レベルの冠状断切片を吻尾的に並べている。c-Fos陽性ニューロンを黒丸で示す。各パネルの左側がFG注入部位と同側。本図で示されたc-Fos陽性

ニューロンの分布は図9でも示されている。Gのスケール＝0.2 mm（A-Fにも適用）

図9

ストレス群ラットで、LHbに認められたc-Fos陽性ニューロンと、VmesへのFG注入でFG標識されたニューロンの分布

case R604で得た結果。A-G：LHbが存在する7レベルの冠状断切片を吻尾的に並べている。c-Fos陽性ニューロンを黒丸で、FG標識ニューロンを赤丸で示す。c-Fos陽性かつFG標識ニューロン（double-labeled neuron）を青丸で示す。各パネルの左側がFG注入部位と同側。Gのスケール＝0.2 mm（A-Fにも適用）。

図10

FG標識されたLHbニューロン（A）、c-Fos陽性のLHbニューロン（B）、c-Fos陽性でFG標識されたLHbニューロン（double-labeled neuron）（C）の顕微鏡写真。

A：VmesへのFG注入で逆行性にFG標識された、注入と同側のニューロン。B：ストレス群のc-Fos陽性ニューロン。C：FG注入と同側のLHbに認められた double-labeled neuron。Cのスケール＝10 μm（A、Bにも適用）。

図11

拘束ストレスを与えなかった（コントロール群）ラットで、LHbに認められたc-Fos陽性ニューロンと、VmesへのFG注入で逆行性にFG標識されたニューロンの分布

case R829で得た結果。A-G：LHbが存在する7レベルの冠状断切片を吻尾的に並べている。c-Fos陽性ニューロンを黒丸で、FG標識ニューロンを赤丸で示す。c-Fos陽性かつFG標識ニューロン（double-labeled neuron）を青丸で示す。各パネルの左側がFG注入部位と同側。Gのスケール＝0.2 mm（A-Fにも適用）。

図12

LHbからVmesへの投射経路図

本研究で明らかとなったLHbからVmesへの直接投射と、これまでの文献を含めて示唆されたLHbからVmesへの、縫線核またはRMTgを介した間接投射をまとめている。LHbからの下行投射はグルタミン酸作動性、外側縫線核または正中縫線核からVmesへの投射はセロトニン作動性、RMTgから縫線核への投射はGABA作動性であると考えられる。

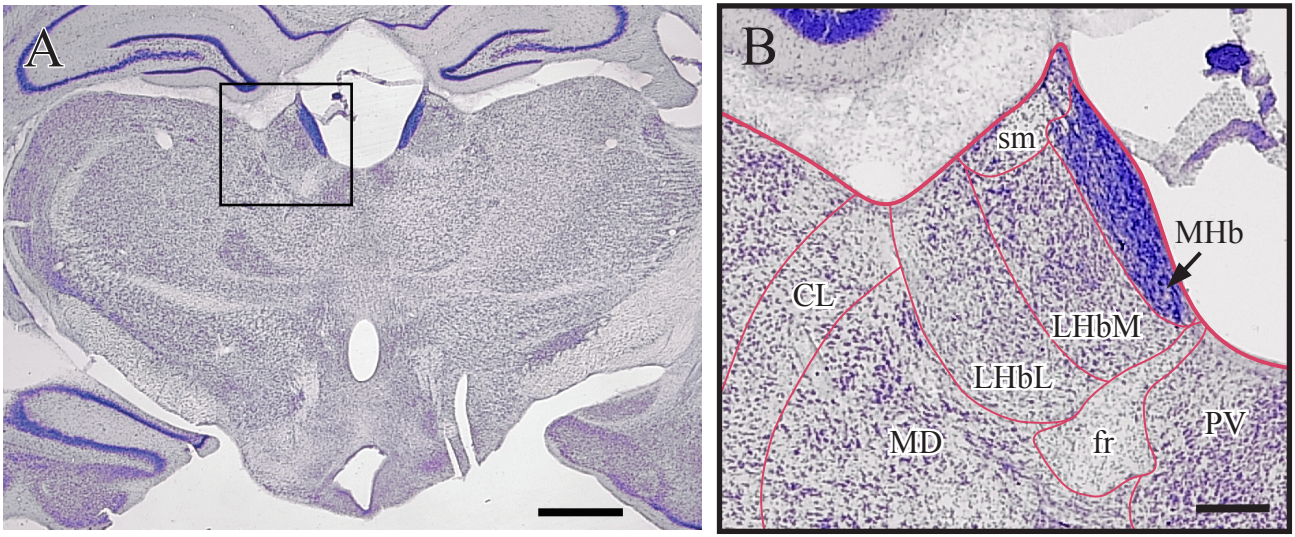


図 1

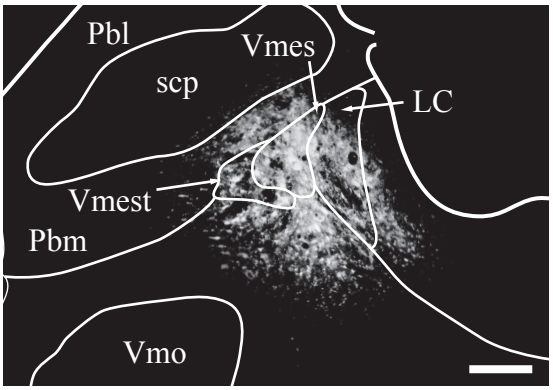


図 2

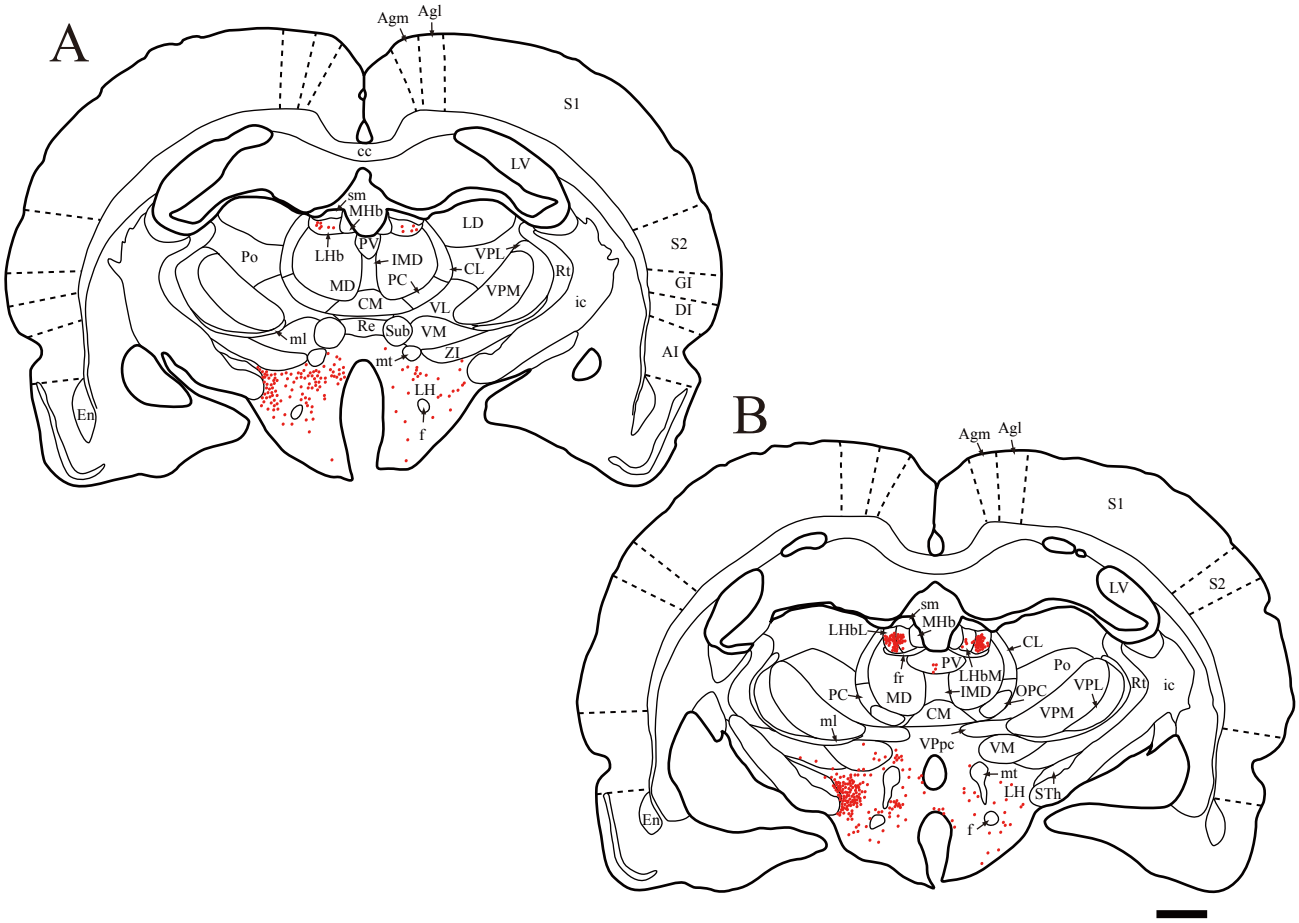

A
Agm
Agl
S1
cc
LV
sm
MHb
LD
Po
LHb
PV
IMD
VPL
S2
CL
Rt
MD
PC
VPM
GI
CM
VL
ic
DI
ml
Re
Sub
VM
AI
mt
ZL
LH
En
f
B
Agm
Agl
S1
LV
S2
sm
MHb
LHbL
CL
PV
fr
LHbM
Po
PC
MD
IMD
OPC
VPL
Rt
ic
CM
VPM
ml
VPpc
VM
mt
LH
STh
En
f

図 3

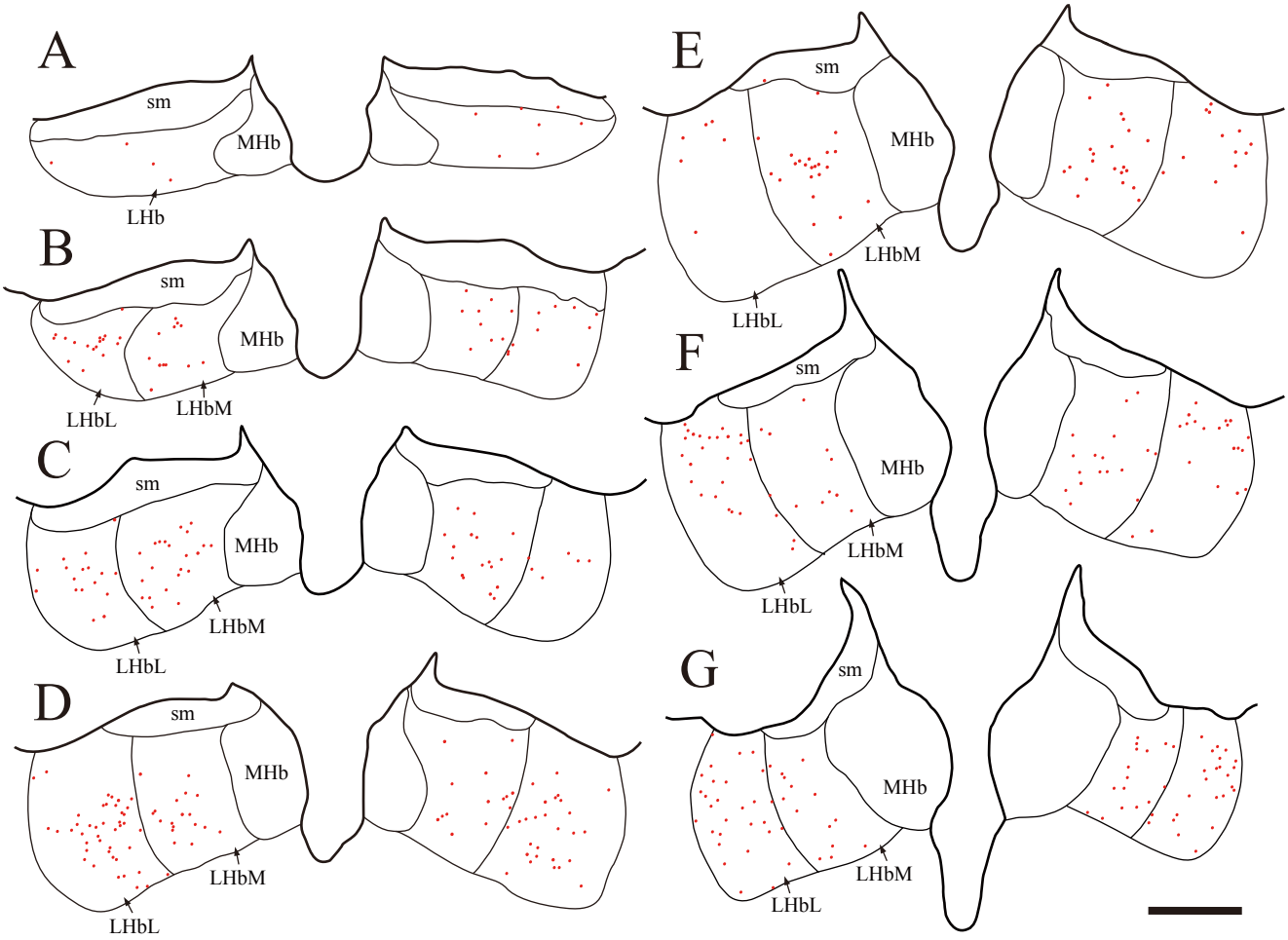

A
sm
MHb
LHb
B
sm
MHb
LHbL
LHbM
C
sm
MHb
LHbM
LHbL
D
sm
MHb
LHbM
LHbL
E
sm
MHb
LHbM
LHbL
F
sm
MHb
LHbM
LHbL
G
sm
MHb
LHbM
LHbL

図 4

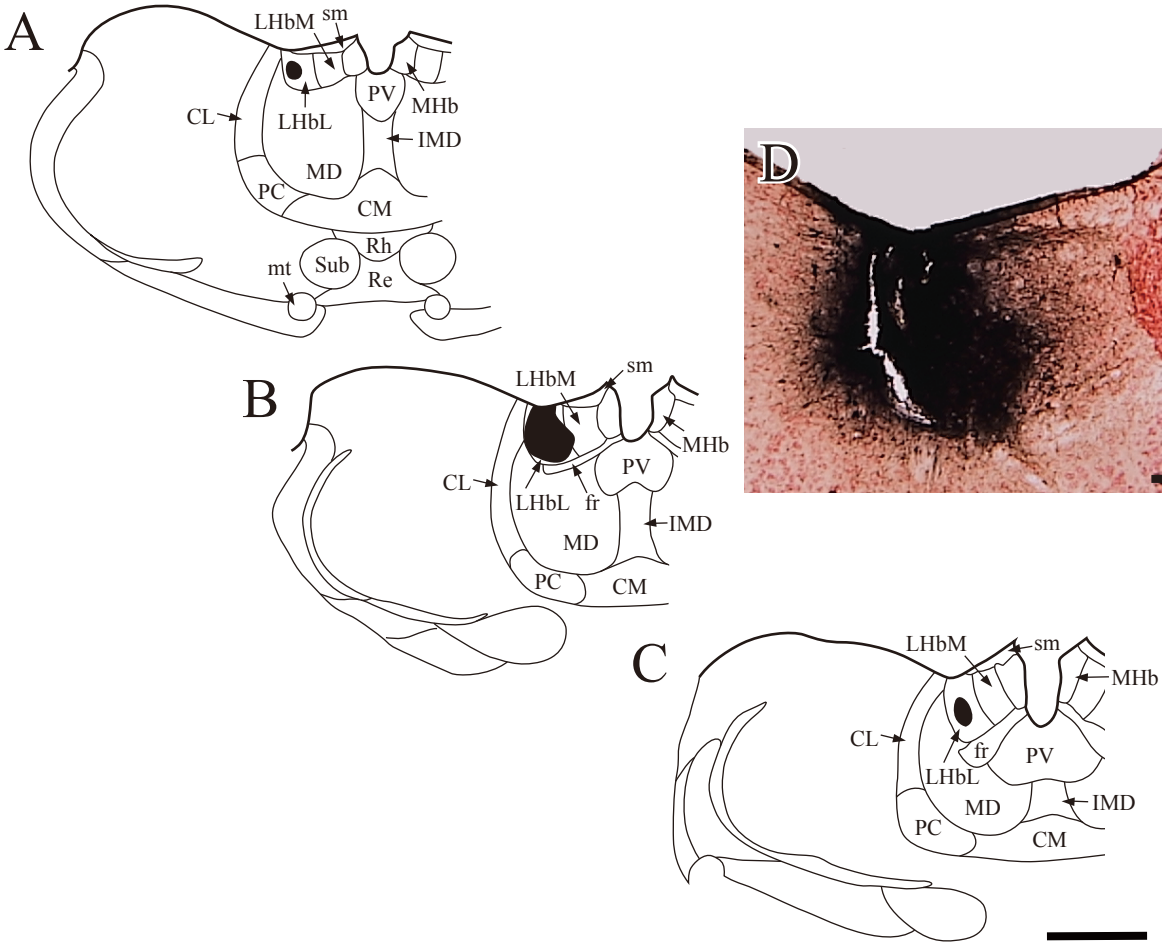

A
LHbM
sm
PV
MHb
CL
LHbL
IMD
MD
PC
CM
Rh
mt
Sub
Re
B
LHbM
sm
MHb
PV
CL
LHbL
fr
IMD
MD
PC
CM
C
LHbM
sm
MHb
CL
fr
PV
LHbL
MD
IMD
PC
CM
D

図 5

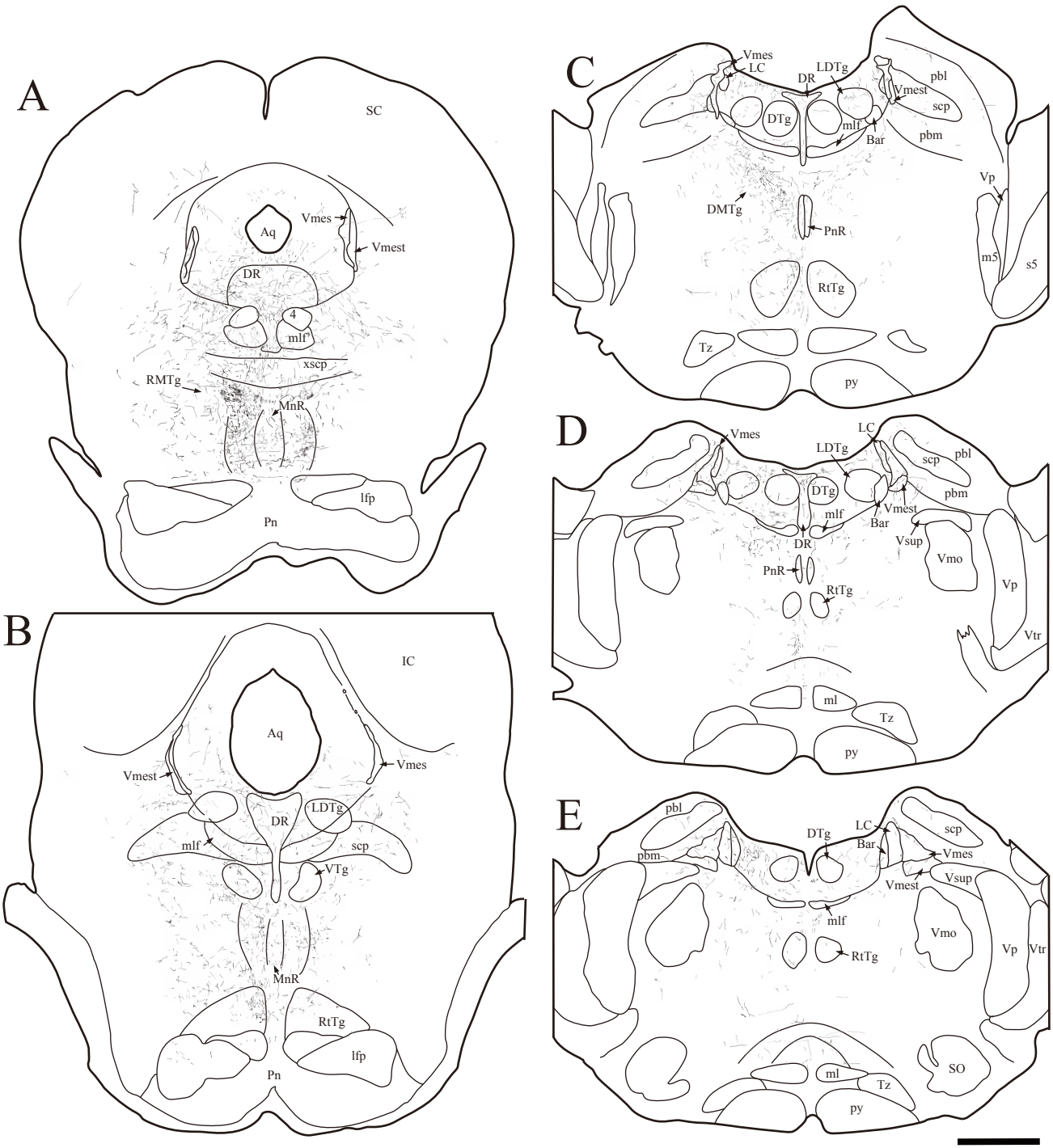

A
SC
Aq
Vmes
Vmest
DR
4
mlf
xscp
RMTg
MnR
lfp
Pn
B
IC
Aq
Vmest
Vmes
LDTg
DR
mlf
scp
VTg
MnR
RtTg
lfp
Pn
C
Vmes
LC
DR
LDTg
pbl
Vmest
scp
DTg
mlf
Bar
pbm
Vp
DMTg
PnR
m5
s5
RtTg
Tz
py
D
Vmes
LC
LDTg
scp
pbl
DTg
pbm
mlf
Vmest
Bar
DR
Vsup
Vmo
PnR
RtTg
Vp
Vtr
ml
Tz
py
E
pbl
DTg
LC
scp
pbm
Bar
Vmes
Vsup
Vmest
mlf
Vmo
RtTg
Vp
Vtr
ml
Tz
SO
py

図 6

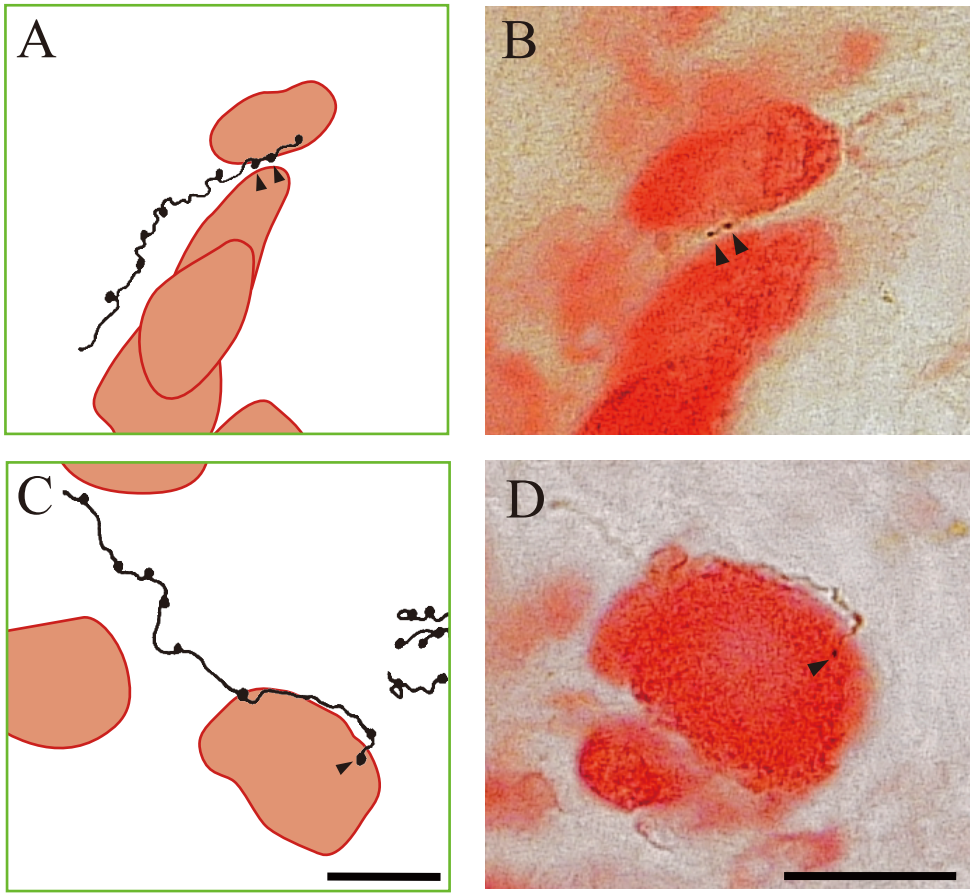


図 7

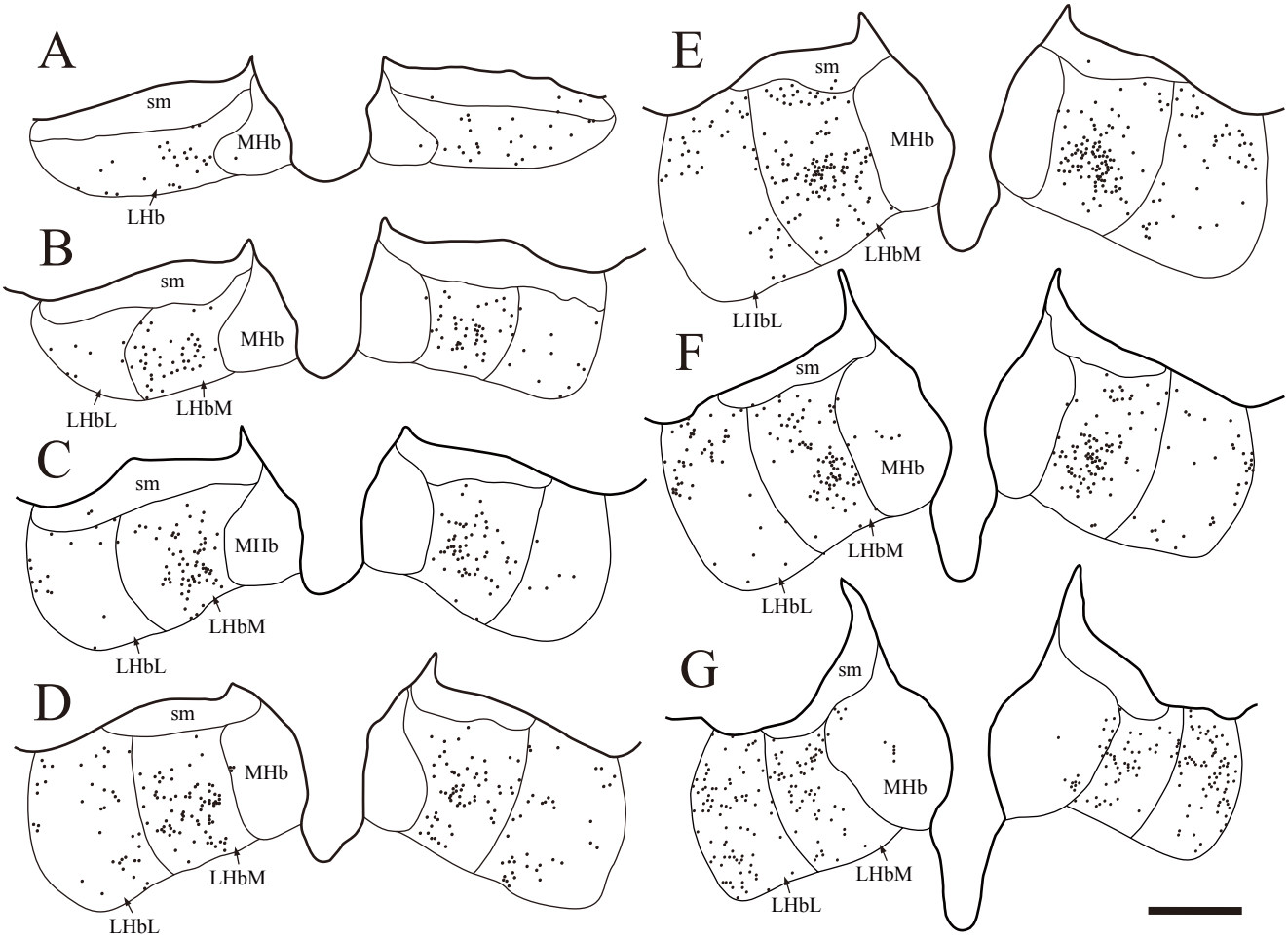

A
sm
MHb
LHb
B
sm
MHb
LHbL
LHbM
C
sm
MHb
LHbM
LHbL
D
sm
MHb
LHbM
LHbL
E
sm
MHb
LHbM
LHbL
F
sm
MHb
LHbM
LHbL
G
sm
MHb
LHbM
LHbL

図 8

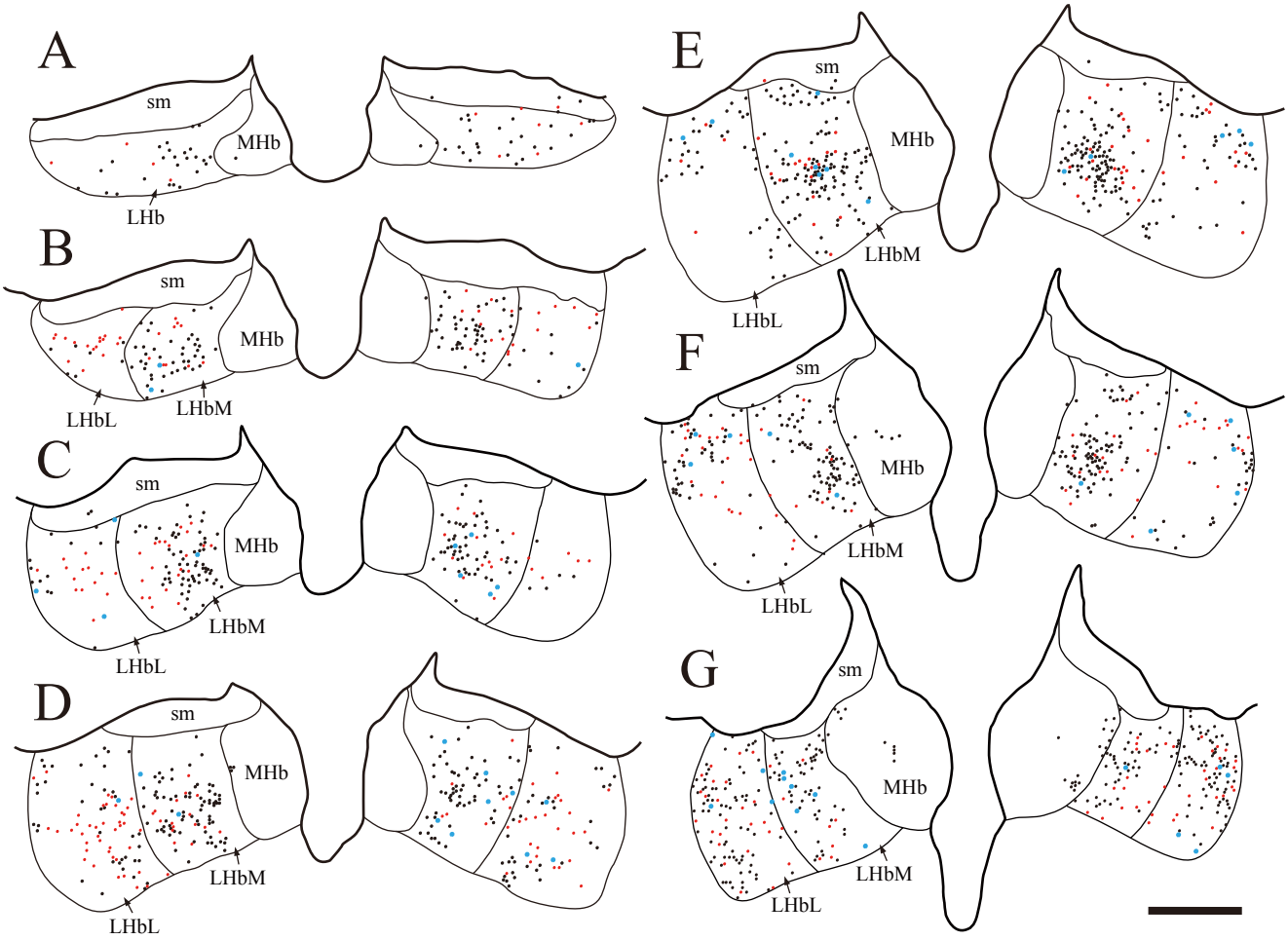
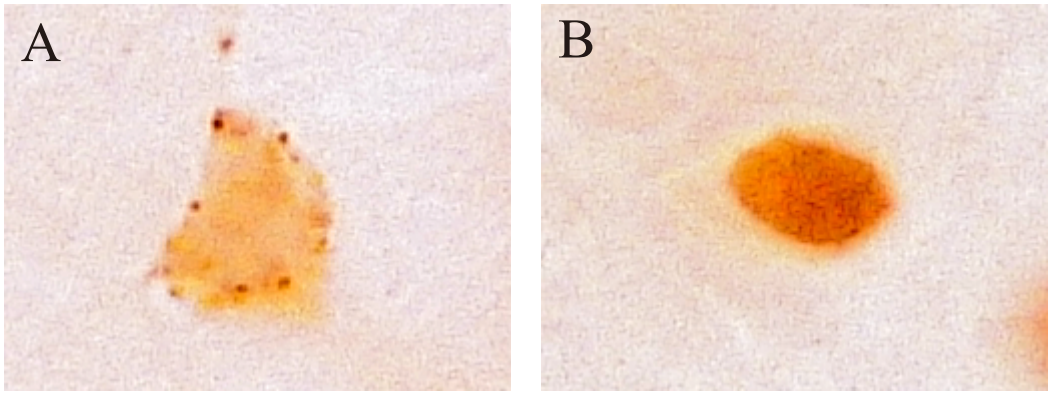

A
sm
MHb
LHb
B
sm
MHb
LHbL
LHbM
C
sm
MHb
LHbM
LHbL
D
sm
MHb
LHbM
LHbL
E
sm
MHb
LHbM
LHbL
F
sm
MHb
LHbM
LHbL
G
sm
MHb
LHbM
LHbL

図 9

FG 標識ニューロン

c-Fos 標識ニューロン



Double-labeled neuron

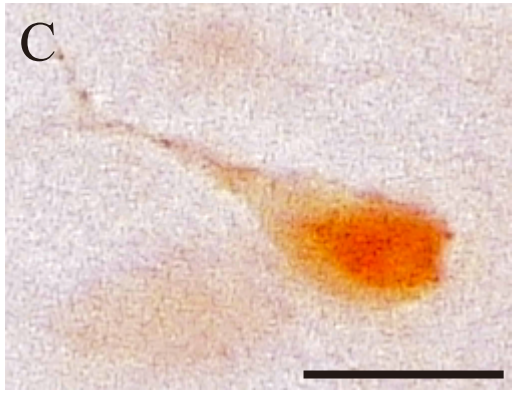


図 10

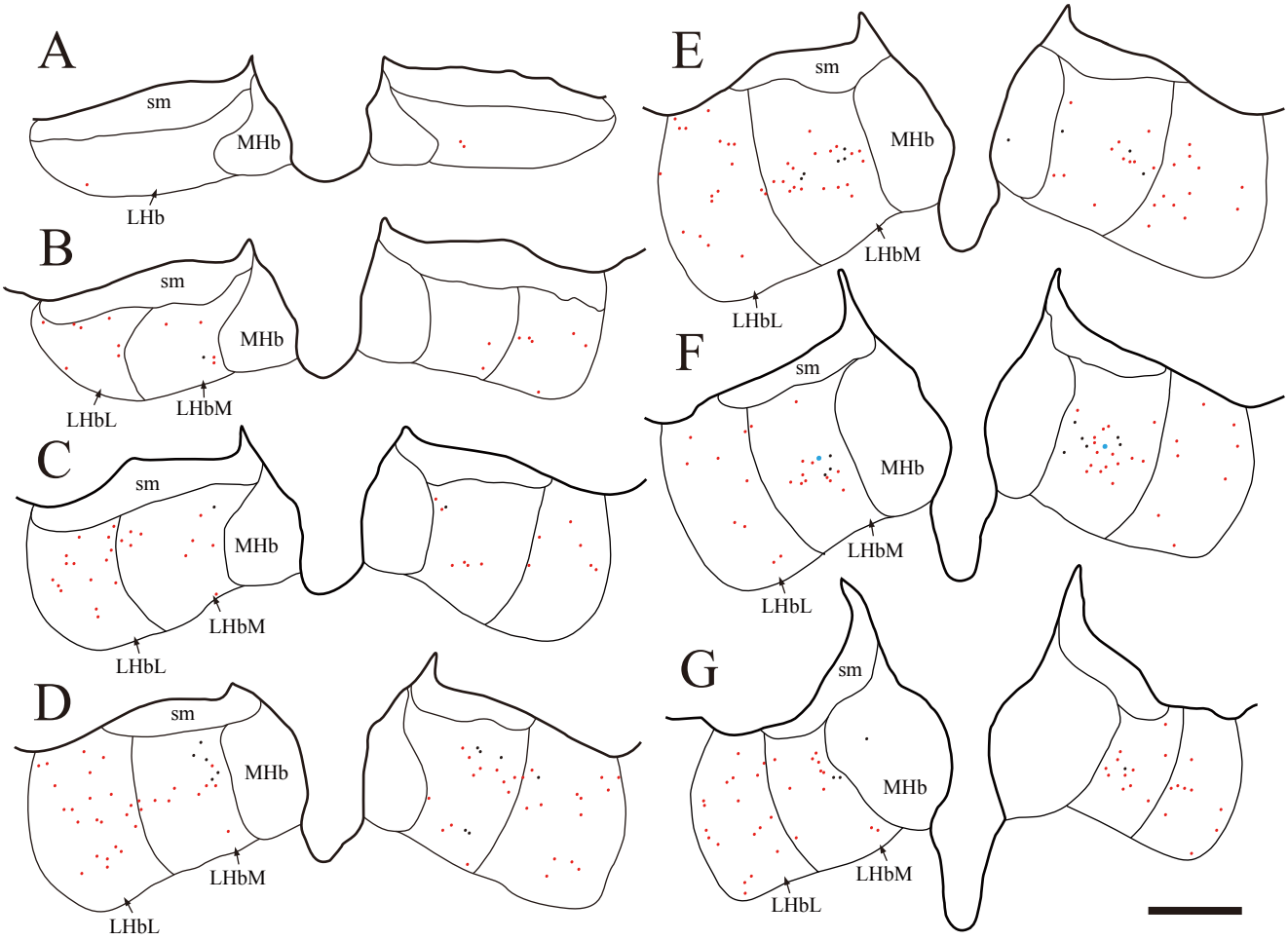

A
sm
MHb
LHb
B
sm
MHb
LHbL
LHbM
C
sm
MHb
LHbM
LHbL
D
sm
MHb
LHbM
LHbL
E
sm
MHb
LHbM
LHbL
F
sm
MHb
LHbM
LHbL
G
sm
MHb
LHbM
LHbL

図 11

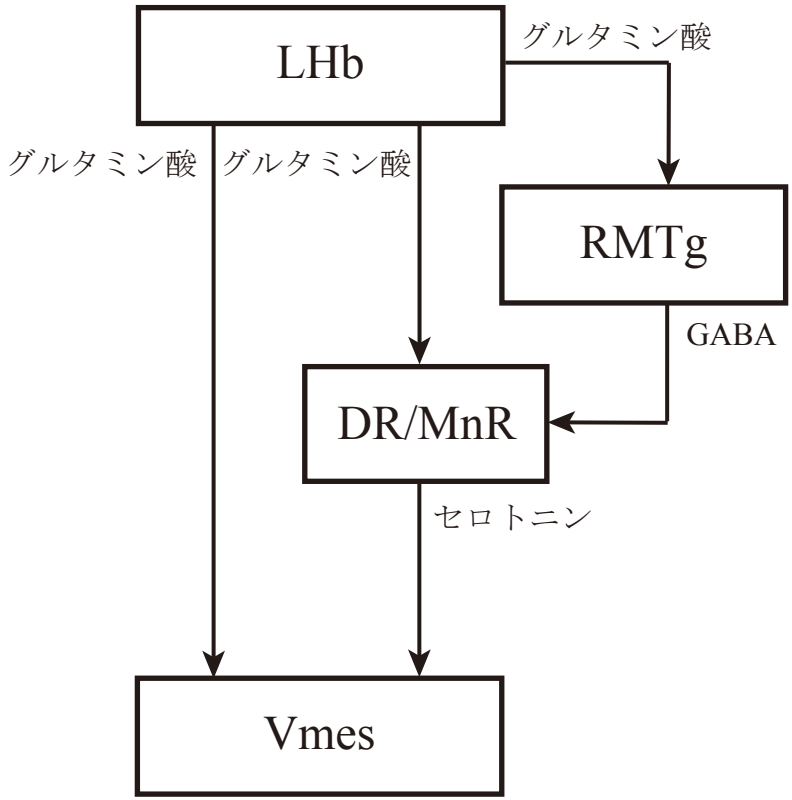


図 12

【謝辞】

稿を終えるにあたり、本研究を行う貴重な機会を与えて頂き、ご懇切なるご指導とご校閲を賜りました大阪大学大学院歯学研究科分子病態口腔科学専攻口腔分化発育情報学講座（顎顔面口腔矯正学教室）山城隆教授、並びに同統合機能口腔科学専攻高次脳口腔機能学講座（口腔解剖学第二教室）吉田篤教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究を遂行するにあたり、多くのご助言とご協力を頂きました顎顔面口腔矯正学教室、並びに口腔解剖学第二教室の教室員の方々に厚くお礼申し上げます。