



Title	レム睡眠中の錐体路刺激に対する頸筋の応答特性
Author(s)	東山, 亮
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/52343
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

レム睡眠中の錐体路電気刺激に対する頸筋の応答特性

大阪大学大学院歯学研究科

統合機能口腔科学専攻

頸口腔再建学講座クラウンブリッジ補綴学分野

東山 亮

概要

レム睡眠では、頸筋運動ニューロンが抑制されているにもかかわらず、口顎ミオクローヌスやリズミカルな顎運動が発生する。すなわち、頸筋運動ニューロンが抑制下にあっても、頸筋前運動ニューロンや顎運動リズム発生機構が賦活され、顎筋活動が発生すると考えられる。しかし、レム睡眠で頸筋前運動ニューロンや顎運動リズム発生機構がどのような活動性を有するのかよくわかっていない。本研究では、頸筋前運動ニューロンや顎運動リズム発生機構に対して、錐体路を介して実験的に興奮性入力を与えることで、レム睡眠で顎筋活動を誘発させることを試み、その応答特性を解析した。

実験には、雄性モルモットを用いた。脳波、眼電図、頸筋・咬筋・顎二腹筋前腹の筋電図を記録できるように外科処置した後、さらに刺激電極を錐体路に設置した。自由行動下で睡眠・覚醒を繰り返す間に、連続電気刺激を繰り返した。短時間連続刺激で誘発した短潜時応答の誘発率、応答の振幅および誘発潜時、さらには長時間連続刺激で誘発したリズミカルな顎運動（Rhythmic jaw movement: 以下 RJM）の誘発率、誘発潜時、RJM バーストの振幅および周期を、各ステージ（覚醒、ノンレム睡眠、レム睡眠）において刺激強度別（2 強度：1.2T、2.0T）に算出した。

その結果、レム睡眠で短時間連続刺激に短潜時応答を示すことがあった。その誘発率や短潜時応答の振幅は、刺激強度 1.2T では覚醒・ノンレム睡眠の約 1/3 であった ($P < 0.016$)。両変数は刺激強度 2.0T では増加したが、振幅は覚醒・ノンレム睡眠より低いま

まであった。誘発潜時にはステージや刺激強度による差を認めなかつた。一方、レム睡眠では、長時間連続刺激を与えていた間に頸二腹筋にリズミカルな活動を誘発することができた。刺激強度 1.2T では、RJM の誘発率が覚醒・ノンレム睡眠の約 1/5 で、振幅は 6 割程度であった ($P < 0.016$)。RJM の誘発潜時は、レム睡眠ではノンレム睡眠よりも有意に短かっただが ($P < 0.016$)、覚醒と同等であった。刺激強度 2.0T では、誘発率・振幅とも刺激強度 1.2T の場合に比較して増加し、誘発潜時は短縮した。バースト周期はステージによる差を認めなかつた。

以上から、レム睡眠では頸筋運動ニューロンの抑制が維持されていても、頸筋前運動ニューロンや頸運動リズム発生機構が活動できるレベルの興奮性を有しており、これらのニューロン群を介して出力された興奮性入力が頸筋運動ニューロンの膜電位を興奮閾値に到達させうるレベルであれば、頸運動が誘発される可能性が示された。

緒言

睡眠中は、覚醒と異なり筋緊張が低下し、運動発現が減少する一方で、様々な頸筋運動が発現することが知られている (Kato et al., 2011, Kato et al., 2013b)。たとえば、歯科医学領域でよく知られている睡眠中の過剰な頸筋運動を示す睡眠時プラキシズムはその一つであり、歯の咬耗や破折、補綴装置の破損や脱離、口腔顔面痛や頭痛の原因となると考えられている (Kato and Lavigne, 2010, Carra et al., 2012)。しかし、これまでのところ睡眠中に頸筋の活動が起こるメカニズムはよくわかつていない。

睡眠は2種類のステージに区別される (McCarley, 2007)。皮質脳波に徐波が出現し、血圧、呼吸などの自律性機能の変化が少ないノンレム睡眠と、新皮質脳波に低振幅速波が出現し、自律機能が不規則に変化するレム睡眠である。さらにノンレム睡眠とレム睡眠では、運動機能を調節する中枢神経機構に相違があることが知られている (McCarley, 2007)。ノンレム睡眠では、覚醒中に運動ニューロンの興奮性を維持しているグルタミン酸、セロトニン、ノルアドレナリン作動性ニューロンの活動が低下する (Burgess et al., 2008; Takahashi et al., 2010; Leung and Mason, 1999; Sakai and Crochet, 2001)。そのため、三叉神経運動ニューロンの膜電位 (Chandler et al., 1980; Nakamura et al., 1978; Pedroarena et al., 1994)、頸筋のトーネス (Okura et al., 2006; Kato et al., 2003; Kato et al., 2004) は覚醒に比べて低下するが、ノンレム睡眠中に開閉口筋に誘発された反射応答は覚醒と大差がないことが報告されている (Chase, 1970; Inoue et al., 1999)。

一方、レム睡眠ではセロトニン、ノルアドレナリン作動性ニューロンの活動が停止することに加え (Takahasi et al., 2001; Sakai et al., 2001)、GABA およびグリシン作動性ニューロンの働きにより運動ニューロンがシナプス後抑制を受けて過分極となる (Nakamura et al., 1978; Chase et al., 1980)。その結果、頸筋トーヌスや開閉口筋の反射応答は覚醒およびノンレム睡眠よりも大幅に低下する (Brooks and Peever, 2012; Schwartz et al., 2014; Burgess et al., 2008; Kato et al., 2003; Okura et al., 2006; Chase, 1970; Inoue et al., 1999)。したがって、レム睡眠では三叉神経運動ニューロンの興奮性が大幅に低下しており、興奮性の入力により運動ニューロンが興奮せず、頸筋の活動がほとんど生じないと考えられている (Pedroarena et al. 1994, Chase et al. 1980)。

しかし、ヒトや実験動物では、レム睡眠時に頸筋の単収縮やリズミカルな頸運動 (Rhythmic jaw movement: 以下 RJM) が発生することが報告されている (Lu et al., 2009; Burgess et al., 2008; Kato et al., 2013a; Kato et al., 1999)。また、レム睡眠行動異常症など、レム睡眠の運動抑制機構が障害された疾患では、頸筋活動がレム睡眠で多発することが報告されている (Abe et al., 2013; Frauscher et al., 2008)。これらの報告から、レム睡眠で頸筋運動ニューロンが抑制された状態でも、前運動ニューロンや頸運動リズム発生機構が活動できる状態にある可能性がある。さらに、頸筋活動を生じさせるためには、運動ニューロンへの抑制効果を凌駕する強い興奮性入力がこれらのニューロン群から発せられる可能性が推察されている (Chase and Morales, 1983)。また、RJM が発生することから、

頸運動リズム発生機構が活動する可能性も否定できない。しかし、これらの可能性を実験動物のレム睡眠で実験的に検証した研究はない。

麻酔下の実験動物に脳内電気刺激を与えると、頸運動を誘発できる (Lund, 1991; Nakamura and Katakura, 1995)。とくに、錐体路を形成するニューロンは、頸筋前運動ニューロンや頸運動リズム発生機構に直接投射するため (Yoshida et al., 2009; Enomoto et al., 1995)、これまで大脳皮質や錐体路に連続電気刺激を与えて頸運動を誘発する実験モデルが頻繁に用いられてきた(モルモット: Goldberg et al., 1982; Chandler and Tal, 1986; Nozaki et al., 1986; ウサギ: Lund et al., 1984; Komuro et al., 2001; Liu et al., 1995; ラット: Uchino et al., 2014; Satoh et al., 2007)。また、錐体路に刺激条件の異なる連続電気刺激を与えると、短時間連続刺激では単収縮を、長時間連続刺激では RJM を誘発することができる (Chandler and Tal, 1986)。したがって、錐体路を電気刺激する実験モデルは、レム睡眠中に頸筋前運動ニューロン群や頸運動リズム発生機構のニューロン群に興奮性入力を直接伝達し、さらにこれらのニューロン群からの出力を、頸筋運動ニューロンに伝達する実験手段として利用できると考えられる。

そこで本研究では、三叉神経前運動ニューロンや頸運動リズム発生機構に投射する錐体路を電気刺激する実験モデルを用いて、レム睡眠中にこれらニューロン群を活動させて頸筋活動を誘発することを試みるとともに、錐体路刺激によって誘発した頸筋活動の応答性を調べた。

方法

1. 実験動物

本研究では Hartley 系雄性モルモット（体重 550 g～800 g）10 匹を用いた。実験は大阪大学歯学研究科動物実験委員会の承認のもと、大阪大学歯学研究科実験動物取扱指針およびアメリカ合衆国の NIH (National Institutes of Health) のガイドラインに従って行い、使用動物数および動物に与える苦痛が最小限になるように努めた。

2. 外科手術

麻酔前投薬として硫酸アトロピン (0.05 mg/kg、アトロピン硫酸塩®、田辺製薬、大阪) を皮下投与した後、ペントバルビタールナトリウム (50 mg/kg、ネンプタール®、大日本製薬、大阪) の腹腔内投与および、塩酸キシラジン (50 mg/kg、スキルペン 2% 注射液®、インターベット、大阪) の筋肉内投与により全身麻酔を行った。すべての切開部にはリドカイン (2%、キシロカイン®、アストラゼネカ、大阪) による局所麻酔を施した。

頭頂部の皮膚を切開し、頭蓋骨を明示して骨膜を剥離した。その後、歯科用レジンセメント (スーパーボンド®、サンメディカル、滋賀) にて露出させた頭蓋骨の表層を覆い、脳波記録用ネジ電極を左右前頭骨に、眼電図用ネジ電極を左側前頭骨の眼窩の前後端に、生体アース用ネジ電極を前頭縫合付近の頭頂骨にそれぞれ設置した。また、刺激電極の不関電極用ネジ電極を頭頂骨後部に設置した。それぞれのネジ電極に、電極用ワイヤー (FEP

Multiconductor Cable、Cooner Wire、米国：アース用 40 mm、脳波用 40 mm、眼電図用 40 mm) をハンダ付けした。頸筋筋電図記録用に両側咬筋および両側頸二腹筋前腹を剖出した後、電極用ワイヤー（咬筋用 110 mm、頸二腹筋前腹用 130 mm）を側頭部から皮下を通して頸下部まで貫通させ、それぞれの筋に一対ずつ約 5 mm 間隔で刺入した。また、頸筋筋電図記録用に、電極用ワイヤー（頸筋用 90 mm）を右側の頸筋に一対刺入した。さらに心電図記録のため、左側胸部の肋間筋に電極用ワイヤー（心電図用 200 mm）を、頭頂骨にネジ電極を設置した。すべての電極用ワイヤーは皮下を通して頭頂部に誘導し、ケーブル接続用コネクタに接続した。その後、コネクタを頭蓋骨上に歯科用即時重合レジン（アドファア、松風、京都）を用いて固定した。動物を脳定位固定装置（成茂科学器械研究所、東京）に固定する固定源として、アルミニウム製パイプ（外径 7.5 mm、内径 5.0 mm、プロシード、長野）を後頭部に、ナットを前頭部に歯科用即時重合レジンを用いて設置した。コネクタと刺激電極の刺入予定部位に相当する部位の頭蓋骨を露出させ、表層を歯科用即時重合レジンで一層覆った。その後、切開部を縫合した。

3. 順化トレーニング

手術 7 日後以降から、刺激実験で使用する記録用防音箱内で、動物を実験環境に順化させるためのトレーニングを行った。順化トレーニングは、摂食および飲水が可能な自由行動下で、刺激実験と同様に記録ケーブルを動物の頭部に設置したコネクタに接続して、1 回

3時間程度行った。これを次の刺激電極留置実験までに5~6回行った。

4. 刺激電極留置実験

外科手術10~14日後、動物が十分に回復したことを確認し、刺激電極の留置実験を行った。ケタミン(40 mg/kg、ケタラール®、第一三共、東京)と塩酸キシラジン(50 mg/kg、スキルペン2%注射液®、インターペット、大阪)の混合麻酔下にて、動物を脳定位固定装置に装着した。右側錐体路に刺激電極を刺入できるようにBregmaの後方10 mmから15 mm、正中から右側5 mmの範囲の中脳を被蓋する頭蓋骨の一部をラウンドバーで開窓し、脳硬膜を露出した。開窓の脳表面から鉛直方向にガラス被覆金属電極を50 μmずつ刺入し、電極刺入の各ステップで順に陰性矩形波を用いた長時間連続刺激(パルス持続時間: 200 μsec、頻度: 30 Hz、パルス数: 60~120発、強度: 30~100 μA)を与えて、RJMを誘発できる部位を探査した。刺激パルスは、電気刺激装置(SEN-3301、日本光電、東京)で生成し、アイソレーター(ss-202J、日本光電、東京)を介して出力した。最も低い刺激強度で頸二腹筋にリズミカルな活動を示すRJM誘発部位を同定した後、短時間連続電気刺激(パルス持続時間: 200 μsec、頻度: 500 Hz、パルス数: 3発、強度: 30~100 μA)を与え、刺激側とは反対側優位の頸二腹筋に約10 msec相当の短潜時応答を誘発できることを確認した。その後、その部位に刺激電極を保持したまま、刺激電極を取り囲むように骨削除部位に歯科用セメント(ネオダイン®、ネオ製薬、東京)を充填し、さらに刺激電極を頭蓋骨と強

固に固定するために歯科用即時重合レジンで被覆し、刺激用コネクタに接続した後、歯科用即時重合レジンにて頭頂骨後部へ固定した。

5. 刺激実験

電極留置実験の1～3日後から、刺激実験を行った。記録開始前に、安静覚醒時に10回程度の長時間連続刺激（パルス持続時間: 200 μ sec、頻度: 30 Hz、パルス数: 60 発、強度: 35～120 μ A）を与えて、RJM を約 60% の頻度で誘発できる最低の刺激強度を基準強度 1.0T (35～120 μ A) と設定した。

刺激実験は、記録用防音箱の中で摂食・飲水の可能な自由行動下にて行い、短時間連続刺激（パルス持続時間: 300 μ sec、頻度: 500 Hz、パルス数: 3 発）および、長時間連続刺激（パルス持続時間: 200 μ sec、頻度: 30 Hz、パルス数: 60 発）の2条件を用いた。刺激強度は基準強度の1.2倍 (1.2T) とし、一部の動物については基準強度の2.0倍 (2.0T) の強度も併せて用いた。短時間連続刺激は、10秒おきに1回の刺激を与えた。長時間連続刺激は、脳波・眼電図・頸筋の筋電図波形と、防音箱内に設置した赤外線カメラで動物の動態を視覚的に確認しながら、安静覚醒、ノンレム睡眠、レム睡眠を同定し、任意のタイミングで刺激を与えた。安静覚醒は行動に伴う筋活動を認めず、脳波に低振幅速波を認める期間とし、ノンレム睡眠は規則性をもった頸筋活動を認めず、脳波の高振幅徐波を認める期間とした、レム睡眠は脳波に覚醒に類似した低振幅速波を認め、かつ頸筋トーヌスの減少や急速

眼球運動や、頸筋の単収縮（twitch）を認める期間とした（Kato et al., 2007; Kato et al., 2010）。

脳波、眼電図、心電図、筋電図の各信号は、多用途監視記録装置（RPM-6008M, 日本光電、東京）により増幅し、A/D 変換器（Power1401, Cambridge Electronic Design, 英国）にてデジタル信号に変換後、波形解析ソフト Spike2（Cambridge Electronic Design, 英国）を用いてパーソナルコンピューター（Endeavor MT7900, EPSON, 長野）に記録した。

6. 組織学的観察

自由行動下での刺激実験終了後、ペントバルビタールナトリウム麻酔を施し、動物を脳定位固定装置に装着した後、直流電流（ $15 \mu\text{A}$, 30 sec）を通電して、刺激部位の組織を電気凝固した。その後、ペントバルビタールナトリウムを過剰投与して、上行大動脈を介して 0.02 M リン酸緩衝食塩水（PBS, pH 7.4）1000 ml、4% パラホルムアルデヒドを含む 0.1 M リン酸緩衝食塩水（PBS, pH 7.4）1000 ml、10% スクロースを含む 0.02 M PBS（pH 7.4）400 ml、20% スクロースを含む 0.02 M PBS（pH 7.4）400 ml を順次灌流した。その後、脳を摘出し、20% スクロースを含む 0.02 M PBS（pH 7.4, 4°C）に数日間浸漬した。脳を凍結させ、厚さ $65 \mu\text{m}$ の連続冠状切片を作製し、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。その後 neutral red による染色を施し、脱水、透徹し、カバーガラス

をかけた。組織切片作成後、光学顕微鏡を用いて刺激電極が錐体路へ刺入されていた部位を観察した。

7. 解析

(1) 睡眠・覚醒の判定

睡眠・覚醒状態を Spike2 に記録された脳波・眼電図・頸筋・頬筋の活動をもとに、刺激がどの状態で加わったか判定した。なお、覚醒については摂食・飲水など明らかな行動中に与えられた刺激は、後の解析から除外し、安静覚醒時に刺激が与えられたもののみ解析に用いた。

(2) データ解析

- ・短潜時応答の解析

短潜時応答の誘発は、短時間連続刺激の 1 発目のトリガーパルスの開始後 5~12 ms までの間に基線を超える振幅の変化を認めたものとした。それぞれの刺激強度において、刺激回数に対する短潜時応答の誘発率を、覚醒・ノンレム睡眠・レム睡眠に分けて算出した。さらに短時間連続刺激開始から、短潜時応答の振幅の最大値までの時間を計測し、それを潜時とした。

- ・RJM の応答性の解析

RJM は、長時間連続刺激開始後に少なくとも頸二腹筋に 3 回以上連続した活動を認

めたものとした。刺激回数に対する RJM の誘発率を、各刺激強度について覚醒・ノンレム睡眠・レム睡眠に分けて算出した。また RJM のバーストを構成する複数の短潜時応答の振幅の平均値をバーストの振幅として求めた。さらに、長時間連続刺激開始から、頸二腹筋筋電図の活動が開始されるまでの時間を潜時とした。また、長時間連続刺激の個々の刺激パルスに対応して出現した短潜時応答の振幅をプロットして直線で結び、その間隔を計測することで RJM のバースト周期を求めた。

8. 統計処理

誘発した短潜時応答の誘発率、応答の振幅と潜時、RJM の誘発率、バーストの振幅と潜時、およびバースト周期を、刺激強度別にステージ間で比較するため、paired *t* tests を用い、Bonferroni 調整を行った。有意水準は $\alpha = 0.05/3 = 0.016$ を採用した。

結果

1. 短時間連続刺激の結果

(1) 短潜時応答の誘発率

短潜時応答の誘発率の解析に用いた刺激回数は、1匹あたり平均 93.6 ± 8.1 回であった。そのうち安静覚醒中に与えた刺激回数は平均 32.9 ± 4.0 回、ノンレム睡眠中に与えた刺激回数は平均 35.6 ± 5.0 回、レム睡眠中に与えた刺激回数は 25 ± 2.5 回であった。与えた短時間連続刺激の中には、覚醒・ノンレム睡眠・レム睡眠それぞれで頸二腹筋筋電図に短潜時応答を誘発したものがあった (Fig. 1A, B, C, D, and E)。短潜時応答の誘発率は刺激強度 $1.2T$ では覚醒で $97.7 \pm 0.8\%$ 、ノンレム睡眠で $93.6 \pm 2.0\%$ であったのに対し、レム睡眠では $35.8 \pm 4.6\%$ と誘発率は約 $1/3$ に減少した ($P < 0.016$) (Fig. 2A)。一方、刺激強度 $2.0T$ では覚醒で 100% 、ノンレム睡眠中で 100% であり、レム睡眠でも $92.7 \pm 3.1\%$ まで増加し、ステージ間で差がなくなった (Fig. 2B)。

(2) 短潜時応答の振幅

短潜時応答の振幅 (Fig. 3A) は、刺激強度 $1.2T$ では覚醒で 1.23 ± 0.19 mV、ノンレム睡眠では 1.18 ± 0.21 mV であったが、レム睡眠では 0.36 ± 0.04 mV で、覚醒・ノンレム睡眠の約 $1/3$ まで低下した ($P < 0.016$) (Fig. 3B)。刺激強度 $2.0T$ では覚醒で 1.89 ± 0.32 mV、ノンレム睡眠で 1.92 ± 0.32 mV、レム睡眠で 0.71 ± 0.20 mV であった。刺激強度 $2.0T$

時の振幅は 1.2T と比較して、すべてのステージで約 1.5 倍に増加した。しかし、1.2T、2.0T どちらの場合もレム睡眠時の振幅は、覚醒・ノンレム睡眠の約 1/3 のままであり、有意に低かった ($P < 0.016$) (Fig. 3C)。

(3) 短潜時応答の潜時

短潜時応答の潜時 (Fig. 4A) は、刺激強度 1.2T では覚醒で 10.1 ± 0.20 msec、ノンレム睡眠で 10.3 ± 0.29 msec、レム睡眠で 10.3 ± 0.30 msec (Fig. 4B) で、ステージ間で差がなかった。また、同様に刺激強度 2.0T でも差がなかった (覚醒: 0.93 ± 0.28 msec、ノンレム睡眠: 0.94 ± 0.66 msec、レム睡眠: 0.97 ± 0.14 msec) (Fig. 4C)。

2. 長時間連続刺激の結果

(1) 長時間連続電気刺激によるリズミカルな顎運動の誘発

リズミカルな顎運動 (RJM) の誘発率の算出に用いた刺激回数は、1 匹あたり平均 105.7 ± 6.3 回であった。そのうち、覚醒中に与えた刺激回数は平均 52.2 ± 5.9 回、ノンレム睡眠中に与えた刺激回数は平均 33.3 ± 1.9 回、レム睡眠中に与えた刺激回数は平均 20.2 ± 1.8 回であった。

安静覚醒中に大脳皮質下行路に長時間連続刺激を与えると、両側顎二腹筋、咬筋に RJM が誘発された (Fig. 5A)。長時間連続刺激開始後、両側顎二腹筋がリズミカルな活動

を行った後、両側咬筋もリズミカルな活動を開始した。また刺激終了後も、両筋に誘発したリズミカルな活動は持続したが、数秒以内に消失した。また、ノンレム睡眠においても刺激中に頸二腹筋にリズミカルなバーストが連続して誘発されるなど、覚醒時と同様のパターンを示すリズム性の筋活動を誘発できた (Fig. 6A)。リズミカルな頸運動を誘発した例では、刺激後にノンレム睡眠特有の脳波の高振幅徐波が消失し、低振幅速波が認められたが、数 10 秒で再び高振幅徐波が出現した。覚醒 (Fig. 5B) およびノンレム睡眠 (Fig. 6B) で生じたリズミカルな頸二腹筋バーストは、時間軸で 30 倍に拡大すると、個々の刺激パルスに対応した短潜時応答によって構成されていることがわかった。

一方、レム睡眠においても RJM が誘発された。しかし、覚醒・ノンレム睡眠と異なり、長時間連続刺激後に活動が継続せず、咬筋活動も誘発されなかった (Fig. 7A)。また、レム睡眠で頸筋活動を誘発した例では、刺激前後の脳波活動に変化は認められなかった。誘発した頸二腹筋の応答の振幅は小さい傾向があったが、刺激のパルスに対応した短潜時応答は確認できた (Fig. 7B)。

(2) RJM の誘発率

RJM の誘発率は、刺激強度 1.2T では覚醒で $93.6 \pm 1.7\%$ 、ノンレム睡眠で $77.1 \pm 4.8\%$ であったのに対し、レム睡眠では $15.3 \pm 2.0\%$ と覚醒の 1/6、ノンレム睡眠の 1/5 に減少した ($P < 0.016$)。一方、刺激強度 2.0T では 1.2T に比べて約 4 倍に上昇し、覚醒で 100%、

ノンレム睡眠で $97.2 \pm 1.5\%$ であったのに対し、レム睡眠では $63.5 \pm 7.4\%$ と、覚醒・ノンレム睡眠よりも低いレベルであったが、統計的有意差を認めなかった。(Fig. 8B)。

(3) RJM を構成するバーストの振幅

刺激強度 1.2T の長時間連続刺激中に誘発された、RJM バーストを構成する左側頸二腹筋の短潜時応答の振幅 (Fig. 9A) は、レム睡眠で 0.20 ± 0.03 mV となり、覚醒の 0.33 ± 0.04 mV、ノンレム睡眠の 0.30 ± 0.04 mV よりも振幅が減少した ($P < 0.016$) (Fig. 9B)。刺激強度 2.0T では覚醒で 0.43 ± 0.10 mV、ノンレム睡眠で 0.41 ± 0.09 mV、レム睡眠で 0.37 ± 0.10 mV とすべてのステージで 1.2T のときよりも振幅の増加傾向を示したが、ステージ間での有意差は認められなかった (Fig. 9C)。

(4) RJM の誘発潜時

長時間連続刺激開始から RJM が生じるまでの潜時 (Fig. 10A) は、刺激強度 1.2T では覚醒で 0.77 ± 0.04 sec、ノンレム睡眠で 1.09 ± 0.06 sec、レム睡眠で 0.74 ± 0.09 sec であった (Fig. 10B)。レム睡眠での誘発潜時は、ノンレム睡眠と比較すると有意に短くなったが ($P < 0.016$)、覚醒と有意差を認めなかった。刺激強度 2.0T での潜時は、1.2T と比べてすべてのステージで減少傾向にあったが (覚醒: 0.50 ± 0.11 sec、ノンレム睡眠: 0.75 ± 0.14 sec、レム睡眠: 0.55 ± 0.07 sec) (Fig. 10C)、ステージ間で有意差を認めなかった。

(5) RJM の周期性

リズミカルな左側顎二腹筋活動を構成する短潜時応答の振幅をグラフ化すると、Fig. 11 のようにその振幅はリズミカルに増減した。そこで個々のバーストの中で短潜時応答が最大となる時点を求め、その間隔を計測してバースト周期とした。バースト周期は、刺激強度 1.2T では覚醒で 210.0 ± 9.6 msec、ノンレム睡眠で 210.9 ± 14.6 msec、レム睡眠で 222.9 ± 12.5 msec であった (Fig. 12A)、刺激強度 2.0T では覚醒で 198.4 ± 4.8 msec、ノンレム睡眠で 203.2 ± 1.4 msec、レム睡眠で 206.5 ± 3.8 msec であった (Fig. 12B)。覚醒・ノンレム睡眠・レム睡眠のいずれの間にも有意な差を認めなかった。

3. 組織学的観察

実験終了後に作製した組織標本を光学顕微鏡を用いて観察したところ、中脳下丘レベルの腹側の錐体路内に組織の凝固部位を認めた (Fig. 13A, B)。今回使用したすべての動物において、刺激部位が錐体路にあったことを確認した。

考察

1. 錐体路刺激による顎運動

大脳皮質や錐体路を刺激して顎運動を誘発する実験手法は、顎運動の制御機構を調

べる実験動物モデルとして使用されてきた (Goldberg and Chandler, 1982; Enomoto et al., 1995; Lund et al., 1984; Liu et al., 1995; Komuro et al., 2001; Isogai et al., 2012)。モルモットの大脳皮質咀嚼野やその下行路である錐体路を電気刺激することで、頸二腹筋に筋活動を誘発できる。無麻酔状態で短時間連続刺激を用いると、麻酔下で大脳皮質咀嚼野や錐体路を刺激した過去の研究と同様に、頸二腹筋に潜時約 10 ms 程度の短潜時応答を誘発できた (Chandler and Goldberg, 1982; Lund et al., 1984)。この応答は皮質下行線維から頸筋運動ニューロンへの興奮伝達経路は、単シナプス性ではなく、少なくとも一つの介在ニューロンを介した oligosynaptic な応答であると考えられている (Lund et al., 1984; Chandler and Tal, 1986)。事実、ラットやモルモットでは、下行路を形成する大脳皮質第 5 層の錐体細胞の軸索は、橋延髄網様体に位置し、頸筋運動ニューロンに投射する頸筋前運動ニューロンに直接投射するが、三叉神経運動ニューロンには投射しないことがわかっている (Yoshida et al., 2009; Enomoto et al., 1995)。一方、今回の実験では無麻酔下で長時間連続刺激を用いると、刺激中にリズミカルな頸二腹筋活動を誘発できた。モルモットにおいて大脳皮質咀嚼野を連続刺激する間に、リズミカルな頸二腹筋活動を誘発できることが、過去の研究でも、麻酔下および無麻酔下で行われた実験で示されている (Chandler and Goldberg, 1982; Enomoto et al., 1995; Isogai et al., 2012)。これらリズミカルな筋活動は錐体路を介して、橋延髄網様体に存在する頸筋前運動ニューロンを含めた頸運動リズム発生機構を構成するニューロン群が活動して生じると考えられている (Chandler and Tal,

1986; Lund and Kolta, 2005; Nakamura and Katakura, 1995)。また、今回の実験で誘発したリズミカルな頸二腹筋活動では、連続電気刺激の個々の刺激パルスに対応した短潜時応答が漸増・漸減した一群の筋バーストが反復して発生した。このような頸二腹筋活動の発生には、頸運動リズム発生機構からのリズミカルな出力によって、頸二腹筋運動ニューロンの膜電位がリズミカルに増減するのと同時に、各刺激パルスに応じて生じる oligosynaptic な経路を介する短潜時の興奮性入力が頸二腹筋運動ニューロンに伝達されることによると考えられる (Chandler and Goldberg, 1982; Chandler and Tal, 1986)。

2. レム睡眠における短潜時応答

本実験では、レム睡眠においても 2 種類の刺激強度を用いた短時間連続刺激によつて、頸二腹筋に短潜時応答を誘発することが可能であることを示した。その一方で、誘発した短潜時応答の潜時は覚醒・ノンレム睡眠・レム睡眠で差がなかったが、短潜時応答の応答性はレム睡眠では覚醒やノンレム睡眠よりも大幅に低下していた。レム睡眠では頸二腹筋運動ニューロンが抑制され、膜電位が過分極状態にある (Pedroarena et al., 1994)。したがって、個々の運動ニューロンレベルでは、錐体路から運動前ニューロン介する oligosynaptic な経路からの興奮性入力によって頸二腹筋運動ニューロンに脱分極が生じても、閾値に達しにくいためであると考えられる。また、運動ニューロンプールの中に、興奮する頸二腹筋運動ニューロンがあるものの、全体としてその総数が少ないことを示唆する

と考えられる。過去の研究では、咬筋单シナプス反射や開口反射は、レム睡眠時ではほぼ消失するか大幅に低下するが、覚醒とノンレム睡眠では大きな差を認めなかつたと報告している (Chase et al., 1968; Chase, 1970; Inoue et al., 1999)。しかし、本研究で、強い強度 (2.0T) の刺激強度を用いると、短潜時応答の潜時は変化せず、さらにその誘発率はほぼ100%にまで上昇し、覚醒・ノンレム睡眠と同等になった。この結果から、刺激強度の増加に伴う、頸二腹筋運動ニューロンへの興奮性入力の増大によって、過分極状態の運動ニューロンの膜電位が脱分極する振幅が増加し、閾値を超えたニューロンが増えたことが考えられる。その結果、レム睡眠の短潜時応答の振幅は1.5倍に増加したと考えられる。しかし、増加した短潜時応答の振幅は、覚醒・ノンレム睡眠と比べて大幅に低いままであった。したがって、レム睡眠であっても、錐体路を刺激して前運動ニューロンを介した経路を賦活して、頸二腹筋活動を誘発できるが、運動ニューロンに対する抑制効果のため刺激効果が減弱しているといえる。

3. リズム性頸運動

モルモットの錐体路に長時間連続刺激を与えると、覚醒・ノンレム睡眠だけでなく、レム睡眠においてもリズミカルな頸運動を誘発することができたことから、レム睡眠でも錐体路からの持続的な興奮性入力によって頸運動リズム発生機構を賦活させうるといえる。長時間連続刺激によって誘発したRJMは、いずれのステージにおいても、2秒間の

長時間連続刺激中に、短潜時応答で構成されるリズミカルな頸二腹筋活動を認め、さらに誘発した頸二腹筋活動は、個々の刺激パルスに対応した短潜時応答の一群が漸増・漸減するパターンであった。したがって、レム睡眠で誘発した RJMにおいても、頸二腹筋運動ニューロンは、頸運動リズム発生機構を介したリズミカルな興奮性入力と、各刺激パルスに対する短潜時の興奮性入力を受けていると考えられる(Chandler and Goldberg, 1982)。しかし、Fig. 8 と Fig. 9 に示すように弱い刺激強度においてレム睡眠における RJM の誘発率と頸二腹筋バーストの振幅が覚醒・ノンレム睡眠と比べると、有意に低くなったことから、レム睡眠では、頸二腹筋運動ニューロンの膜電位が過分極にあるためリズミカルな膜電位の変動は低いレベルに維持されており、短潜時の興奮性入力による過分極成分が加算されても、膜電位が閾値に達しにくい状態にあると考えられる。また、強い刺激強度でレム睡眠の RJM の誘発率・バーストの振幅が他の 2 つのステージと同レベルにまで増加したことから、刺激強度の増強により短潜時応答成分が増加したものと考えられる。

弱い刺激強度 (1.2T) で誘発した誘発潜時は、過去の我々の報告と同様にノンレム睡眠では覚醒よりも延長した (Kato et al., 2014)。本研究では、RJM の誘発潜時はレム睡眠と覚醒では差を認めなかった。強い刺激強度では、誘発潜時が短縮し、3 つのステージで差がなくなった。大脳皮質や錐体路を電気刺激して頸運動リズム発生機構を駆動させるためには、頸運動リズム発生機構を構成する神経網内で興奮性入力が加重する必要がある (Lund et al., 1984)。したがって、頸運動リズム発生機構内の神経網における興奮性入力の加重効

率はレム睡眠と覚醒とで同等であるが、ノンレム睡眠では低下している可能性がある。しかし、誘発した RJM の頸二腹筋バースト周期は、刺激の強弱や覚醒・ノンレム睡眠・レム睡眠で差を認めないことから、頸運動リズム発生機構内でリズム性の興奮性出力を生成するニューロン群の組み合わせに違いはないものと考えられる。

レム睡眠では、覚醒・ノンレム睡眠とは異なり、刺激終了後にリズミカルな咬筋の活動が発生せず、頸二腹筋の活動も消失した。我々の先行研究では、ノンレム睡眠では錐体路への長時間連続刺激後に RJM が継続するためには、数秒間の覚醒脳波の出現や心拍数の増加といった覚醒状態に短時間移行することが必要である可能性を示した (Kato et al., 2014)。レム睡眠においても筋活動の出現には覚醒状態に移行することが必要と考えられている (Kato et al., 2004; Kato et al., 2013)。しかし、本実験では、RJM を誘発しても刺激後の脳波の変化や頸筋の活動上昇など (Kato et al., 2010; Lu et al., 2005)、レム睡眠から覚醒への移行を示す徵候を認めなかったため、刺激後に RJM が継続する例がなかったと考えられる。

4. 臨床的意義

本研究の結果から、レム睡眠において、錐体路を介した興奮性入力が頸筋前運動ニューロンや頸運動リズム発生機構を活動させることができることが可能であることが示唆された。しかし、誘発した頸二腹筋活動の発現やその振幅は抑えられていたため、レム睡眠中の運動ニ

ニューロンに対する持続的な抑制は錐体路刺激によって変化しなかったと考えられる。レム睡眠で頸筋運動ニューロンの膜電位は過分極状態でも変動することが報告されており、運動が生じていなくても常に頸筋運動ニューロンには上位中枢から興奮性入力が加わっていると考えられている (Chase et al., 1983; Pedroarena et al., 1994)。また、強い強度の刺激によって運動ニューロンへの興奮性入力を増加させると頸二腹筋活動の誘発率や振幅が増加することから、レム睡眠に異常がない被験者や実験動物のレム睡眠中に観察される単収縮やリズミカルな頸筋活動の発現 (Lu et al., 2009; Kato et al., 1999; Kato et al., 2013) には、頸筋前運動ニューロンや頸運動リズム発生機構から出力される興奮性出力の総和が、過分極状態の膜電位を運動ニューロンの興奮閾値に達するのに十分な脱分極をもたらすことによって生じると考えられる。

一方、レム睡眠の運動抑制機構が障害されるレム睡眠行動異常症では、レム睡眠中に骨格筋の活動が多発し、夢の内容が異常行動として出現する (Fantini et al., 2005)。また、レム睡眠行動異常症の患者では、頸筋に孤発性または反復性のミオクローヌスや、リズミカルな頸運動が出現する (Abe et al., 2013)。レム睡眠行動異常症で出現するレム睡眠中の異常運動を引き起こす中枢はいまだ不明であるが、近年、大脳皮質運動野がその中枢の候補である可能性が提案されている (Luppi et al., 2013)。本実験では、大脳皮質運動野からの下行纖維を含む錐体路を刺激し、レム睡眠中に頸筋活動を誘発したが、この結果がレム睡眠で自然発生する頸筋活動の中枢が大脳皮質運動野であるとする前に、実験モデルの方法論的

限界を考慮する必要がある。まず、レム睡眠で自発的に生じた RJM は咬筋活動優位であるが (Kato et al., 2013b)、本実験で誘発した RJM は頸二腹筋の活動が優位であるので、本実験では、実際にレム睡眠で活動する頸運動リズム発生機構のニューロン構成とは異なるニューロン群を賦活したと考えられる。さらに、扁桃体などレム睡眠で活動の増加を示す大脳皮質以外の脳部位(Zhang et al., 1986; Ravagnati et al., 1979) にも、前運動ニューロンや頸運動リズム発生機構へ直接投射するニューロンが存在する (Mascaro et al., 2009; Yasui et al., 2004)。しかし、大脳皮質を始め、これらの投射ニューロンが存在する脳部位がレム睡眠の RJM の発生時に、どのような活動を示すのかよくわからっていない。したがって、本研究で得られた結果は頸運動発生の中核を同定したものではなく、一定以上の強度の興奮性入力を頸筋前運動ニューロンや頸運動リズム発生機構に与えたことによる頸筋への効果と考えるのが妥当と思われる。

結論

本研究では、レム睡眠における頸運動制御機構の活動性を調べるため、自由行動下のモルモットの錐体路に異なる 2 種類の連続電気刺激を与える実験を行った。その結果、覚醒・ノンレム睡眠のみならずレム睡眠においても、頸二腹筋に短潜時応答やリズミカルな活動を誘発できた。レム睡眠で誘発した短潜時応答やリズミカルな活動の誘発率や振幅は覚醒・ノンレム睡眠よりも低かった。刺激強度を上げると誘発率は増加したが、振幅は

覚醒・ノンレム睡眠より低いままであった。したがって、レム睡眠中の運動ニューロン抑制機構は、錐体路連続電気刺激には影響されず維持されていても、前運動ニューロンや頸運動リズム発生機構は錐体路を介した興奮性入力に応答できるレベルの興奮性を有していると考えられる。また、前運動ニューロンや頸運動リズム発生機構から出力される興奮性入力が運動ニューロンの膜電位の興奮閾値に達するに足るレベルであれば、レム睡眠でも、覚醒することなく頸運動が発現する可能性が示唆された。

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、御懇切なる御指導と御高闘を賜りました大阪大学大学院歯学研究科統合機能口腔科学専攻顎口腔再建学講座クラウンブリッジ補綴学分野（歯科補綴学第一教室）矢谷博文教授、並びに同口腔科学専攻高次脳口腔機能形態学講座（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、本研究の実験手技を御教授下さり、終始変わらぬ御芳情を賜りました同口腔科学専攻高次脳口腔機能形態学講座（口腔解剖学第二教室）加藤隆史講師に深く感謝致します。

最後に、本研究を遂行するにあたり、多くの御助言と御協力を頂きました歯科補綴学第一教室、並びに口腔解剖学第二教室の教室員の方々に厚く御礼申し上げます。

参考文献

- Abe S, Gagnon JF, Montplaisir JY, Postuma RB, Rompré PH, Huynh NT, Kato T, Kawano F, Lavigne GJ (2013) Sleep bruxism and oromandibular myoclonus in rapid eye movement sleep behavior disorder: a preliminary report. *Sleep Med* 14:1024-1030.
- Brooks PL, Peever JH (2012) Identification of the transmitter and receptor mechanisms responsible for REM sleep paralysis. *J Neurosci* 32:9785-9795.
- Burgess C, Lai D, Siegel J, Peever J (2008) An endogenous glutamatergic drive onto somatic motoneurons contributes to the stereotypical pattern of muscle tone across the sleep-wake cycle. *J Neurosci* 28:4649-4660.
- Carra MC, Huynh N, Lavigne G (2012) Sleep bruxism: a comprehensive overview for the dental clinician interested in sleep medicine. *Dent Clin North Am* 56:387-413.
- Chandler SH, Goldberg LJ (1982) Intracellular analysis of synaptic mechanisms controlling spontaneous and cortically induced rhythmical jaw movements in the guinea pig. *J Neurophysiol* 48:126-138.
- Chandler SH, Nakamura Y, Chase MH (1980) Intracellular analysis of synaptic potentials induced in trigeminal jaw-closer motoneurons by pontomesencephalic reticular stimulation during sleep and wakefulness. *J Neurophysiol* 44:372-382.
- Chandler SH, Tal M (1986) The effects of brain stem transections on the neuronal networks responsible for rhythmical jaw muscle activity in the guinea pig. *J Neurosci* 6:1831-1842.
- Chase MH (1970) The digastric reflex in the kitten and adult cat: paradoxical amplitude fluctuations during sleep and wakefulness. *Arch Ital Biol* 108:403-422.
- Chase MH, Chandler SH, Nakamura Y (1980) Intracellular determination of membrane potential of trigeminal motoneurons during sleep and wakefulness. *J Neurophysiol* 44:349-358.
- Chase MH, McGinty DJ, Sterman MB (1968) Cyclic variation in the amplitude of a brain stem reflex during sleep and wakefulness. *Experientia* 24:47-48.

- Chase MH, Morales FR (1983) Subthreshold excitatory activity and motoneuron discharge during REM periods of active sleep. *Science* 221:1195-1198.
- Dal Bo G, Lund JP, Verdier D, Kolta A (2005) Inputs to nucleus pontis caudalis from adjacent trigeminal areas. *Eur J Neurosci* 22:1987-1996.
- Enomoto S, Kohase H, Nakamura Y (1995) Dual brain stem projection from the cortical masticatory area in guinea-pig. *Neuroreport* 6:1573-1577.
- Fantini ML, Corona A, Clerici S, Ferini-Strambi L (2005) Aggressive dream content without daytime aggressiveness in REM sleep behavior disorder. *Neurology* 65:1010-1015.
- Frauscher B, Iranzo A, Högl B, Casanova-Molla J, Salamero M, Gschliesser V, Tolosa E, Poewe W, Santamaría J, group SSIB (2008) Quantification of electromyographic activity during REM sleep in multiple muscles in REM sleep behavior disorder. *Sleep* 31:724-731.
- Goldberg LJ, Chandler SH, 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* 48:110-138.
- Inoue M, Yamamura K, Nakajima T, Yamada Y (1999) Changes in reflex responses of the masseter and digastric muscles during sleep in freely behaving rabbits. *Neurosci Res* 34:37-44.
- Isogai F, Kato T, Fujimoto M, Toi S, Oka A, Adachi T, Maeda Y, Morimoto T, Yoshida A, Masuda Y (2012) Cortical area inducing chewing-like rhythmical jaw movements and its connections with thalamic nuclei in guinea pigs. *Neurosci Res* 74:239-247.
- Kato T, Masuda Y, Kanayama H, Morimoto T (2007) Muscle activities are differently modulated between masseter and neck muscle during sleep-wake cycles in guinea pigs. *Neurosci Res* 58:265-271.
- Kato T, Masuda Y, Kanayama H, Nakamura N, Yoshida A, Morimoto T (2010) Heterogeneous activity level of jaw-closing and -opening muscles and its association with arousal levels during sleep in the guinea pig. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 298:R34-42.

- Kato T, Masuda Y, Yoshida A, Morimoto T (2011) Masseter EMG activity during sleep and sleep bruxism. *Arch Ital Biol* 149:478-491.
- Kato T, Montplaisir JY, Blanchet PJ, Lund JP, Lavigne GJ (1999) Idiopathic myoclonus in the oromandibular region during sleep: a possible source of confusion in sleep bruxism diagnosis. *Mov Disord* 14:865-871.
- Kato T, Montplaisir JY, Guitard F, Sessle BJ, Lund JP, Lavigne GJ (2003) Evidence that experimentally induced sleep bruxism is a consequence of transient arousal. *J Dent Res* 82:284-288.
- Kato T, Montplaisir JY, Lavigne GJ (2004) Experimentally induced arousals during sleep: a cross-modality matching paradigm. *J Sleep Res* 13:229-238.
- Kato T, Nakamura N, Masuda Y, Yoshida A, Morimoto T, Yamamura K, Yamashita S, Sato F (2013a) Phasic bursts of the antagonistic jaw muscles during REM sleep mimic a coordinated motor pattern during mastication. *J Appl Physiol* 114:316-328.
- Kato T, Yamaguchi T, Okura K, Abe S, Lavigne GJ (2013b) Sleep less and bite more: sleep disorders associated with occlusal loads during sleep. *J Prosthodont Res* 57:69-81.
- Kato, T., Yamada, K., Higashiyama, M., Sato, F., Masuda, Y., Yoshida, A. (2014). Experimentally induced rhythmic jaw movements during NREM sleep in animals. *Sleep* vol 37, A38-102.
- Kato T, Lavigne, GJ (2010). Sleep Bruxism: A Sleep-Related Movement Disorder. *Sleep Med Clin* 5, 9–35.
- Komuro A, Morimoto T, Iwata K, Inoue T, Masuda Y, Kato T, Hidaka O (2001) Putative feed-forward control of jaw-closing muscle activity during rhythmic jaw movements in the anesthetized rabbit. *J Neurophysiol* 86:2834-2844.
- Leung CG, Mason P (1999) Physiological properties of raphe magnus neurons during sleep and waking. *J Neurophysiol* 81:584-595.
- Liu RH, Yamuy J, Xi MC, Morales FR, Chase MH (1995) Changes in the electrophysiological properties of cat spinal motoneurons following the

- intramuscular injection of adriamycin compared with changes in the properties of motoneurons in aged cats. *J Neurophysiol* 74:1972-1981.
- Lu JW, Kubin L (2009) Electromyographic activity at the base and tip of the tongue across sleep-wake states in rats. *Respir Physiol Neurobiol* 167:307-315.
- Lu JW, Mann GL, Ross RJ, Morrison AR, Kubin L (2005) Differential effect of sleep-wake states on lingual and dorsal neck muscle activity in rats. *Respir Physiol Neurobiol* 147:191-203.
- Lund JP (1991) Mastication and its control by the brain stem. *Crit Rev Oral Biol Med* 2:33-64.
- Lund JP, Sasamoto K, Murakami T, Olsson KA (1984) Analysis of rhythmical jaw movements produced by electrical stimulation of motor-sensory cortex of rabbits. *J Neurophysiol* 52:1014-1029.
- Luppi PH, Clément O, Valencia Garcia S, Brischoux F, Fort P (2013) New aspects in the pathophysiology of rapid eye movement sleep behavior disorder: the potential role of glutamate, gamma-aminobutyric acid, and glycine. *Sleep Med* 14:714-718.
- Mascaro, M.B., Prosdócimi, F.C., Bittencourt, J.C., and Elias, C.F. (2009). Forebrain projections to brainstem nuclei involved in the control of mandibular movements in rats. *Eur J Oral Sci* 117, 676-684.
- McCarley RW (2007) Neurobiology of REM and NREM sleep. *Sleep Med* 8:302-330.
- Nakamura Y, Goldberg LJ, Chandler SH, Chase MH (1978) Intracellular analysis of trigeminal motoneuron activity during sleep in the cat. *Science* 199:204-207.
- Nakamura Y, Katakura N (1995) Generation of masticatory rhythm in the brainstem. *Neurosci Res* 23:1-19.
- Nozaki S, Iriki A, Nakamura Y (1986) Localization of central rhythm generator involved in cortically induced rhythmical masticatory jaw-opening movement in the guinea pig. *J Neurophysiol* 55:806-825.

- Okura K, Kato T, Montplaisir JY, Sessle BJ, Lavigne GJ (2006) Quantitative analysis of surface EMG activity of cranial and leg muscles across sleep stages in human. *Clin Neurophysiol* 117:269-278.
- Pedroarena C, Castillo P, Chase MH, Morales FR (1994) The control of jaw-opener motoneurons during active sleep. *Brain Res* 653:31-38.
- Ravagnati, L., Halgren, E., Babb, T.L., and Crandall, P.H. (1979). Activity of human hippocampal formation and amygdala neurons during sleep. *Sleep* 2, 161-173.
- Sakai K, Crochet S (2001) Role of dorsal raphe neurons in paradoxical sleep generation in the cat: no evidence for a serotonergic mechanism. *Eur J Neurosci* 13:103-112.
- Satoh Y, Ishizuka K, Murakami T (2007) Changes in cortically induced rhythmic jaw movements after lesioning of the red nucleus in rats. *Brain Res* 1165:60-70.
- Schwarz PB, Mir S, Peever JH (2014) Noradrenergic modulation of masseter muscle activity during natural rapid eye movement sleep requires glutamatergic signalling at the trigeminal motor nucleus. *J Physiol* 592:3597-3609.
- Takahashi K, Kayama Y, Lin JS, Sakai K (2010) Locus coeruleus neuronal activity during the sleep-waking cycle in mice. *Neuroscience* 169:1115-1126.
- Uchino K, Higashiyama K, Kato T, Haque T, Sato F, Tomita A, Tsutsumi K, Moritani M, Yamamura K, Yoshida A (2015) Jaw movement-related primary somatosensory cortical area in the rat. *Neuroscience* 284:55-64.
- Yasui, Y., Tsumori, T., Oka, T., and Yokota, S. (2004). Amygdaloid axon terminals are in contact with trigeminal premotor neurons in the parvicellular reticular formation of the rat medulla oblongata. *Brain Res* 1016, 129-134.
- 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.X., Harper, R.M., and Frysinger, R.C. (1986). Respiratory modulation of neuronal discharge in the central nucleus of the amygdala during sleep and waking states. *Exp Neurol* 91, 193-207.

図の説明

Fig. 1 錐体路へ短時間連続刺激を与えた一例

A. 覚醒、ノンレム睡眠、レム睡眠で短時間連続刺激を与えた記録例を示す。

ここでは、動物がノンレム睡眠(NREM)からレム睡眠(REM)へ移行した後、覚醒(WAKE)する睡眠覚醒サイクルを確認できる。Stim: 刺激パルス、EEG: 脳波、EOG: 眼電図、Neck: 頸筋の筋電図、L-Mas: 左側咬筋の筋電図、L-Dig: 左側頸二腹筋の筋電図。

B. C. D. E. 破線で囲んだ部分の拡大図。

刺激パルス、左側咬筋筋電図、左側頸二腹筋筋電図を時間軸で 1000 倍に拡大したもの。覚醒 (E)・ノンレム睡眠 (B) では刺激後約 10 msec に、刺激の反対側の頸二腹筋に二峰性の EMG 反応を認める。レム睡眠では応答を認めない場合 (C) や、振幅の小さな二峰性の EMG 反応を認める場合 (D) があった。

Fig. 2 短潜時応答の誘発率

A. 刺激強度 1.2T での短潜時応答の誘発率 ($n=7$, mean \pm S.E.)。

安静覚醒(Wake)とノンレム睡眠(NREM)の間には差を認めなかつたが、レム睡眠(REM)では有意に低かった。 * : $P < 0.016$ 。

B. 刺激強度 2.0T での短潜時応答の誘発率 ($n=3$, mean \pm S.E.)。

安静覚醒(Wake)、ノンレム睡眠(NREM)、レム睡眠(REM)の間で有意な差を認めなか

った。

Fig. 3 短潜時応答の振幅

A. 短潜時応答の振幅を両矢印で示す。

Stim : 刺激パルス、L-Dig : 左側頸二腹筋の筋電図。

B. 刺激強度 1.2T の振幅 (n=7, mean±S.E.)。

安静覚醒(Wake)とノンレム睡眠(NREM)の間には差を認めなかつたが、レム睡眠(REM)時の振幅は有意に低かつた。* : P < 0.016。

C. 刺激強度 2.0T の振幅 (n=3, mean±S.E.)。

振幅はすべてのステージで刺激強度 1.2T の振幅の約 1.5 倍に増加した。安静覚醒とノンレム睡眠の間にはほとんど差を認めなかつたが、レム睡眠時の振幅は有意に低かつた。* : P < 0.016。

Fig. 4 短潜時応答の潜時

A. 短潜時応答の潜時を両矢印で示す。

Stim : 刺激パルス、L-Dig : 左側頸二腹筋の筋電図。

B. 刺激強度 1.2T の潜時 (n=7, mean±S.E.)。

安静覚醒 (Wake)、ノンレム睡眠 (NREM)、レム睡眠 (REM) の間で有意な差を認めなか
った。

C. 刺激強度 2.0T の潜時 (n=3, mean±S.E.)。

安静覚醒、ノンレム睡眠、レム睡眠の間には有意な差を認めなかった。

Fig. 5 安静覚醒時に長時間連続刺激によって誘発した RJM の一例

A. 刺激開始後に頸二腹筋がリズミカルに活動し、刺激終了後にも継続した。刺激終了後には咬筋もリズミカルな活動を示した。Stim: 刺激パルス、EEG: 脳波、EOG: 眼電図、Neck: 頸筋の筋電図、R-Mas: 右側咬筋の筋電図、L-Mas: 左側咬筋の筋電図、R-Mas: 右側頸二腹筋の筋電図、L-Dig: 左側頸二腹筋の筋電図、ECG: 心電図。

B. A. の下線部 (赤) の拡大図 (30 倍)。

両側頸二腹筋のリズミカルなバーストは、個々の刺激のパルスに対応した短潜時応答 (*) によって構成されている。

Fig. 6 ノンレム睡眠で長時間連続刺激によって誘発した RJM の一例

A. 刺激開始後に頸二腹筋がリズミカルに活動し、刺激終了後にも継続した。刺激終了後には咬筋もリズミカルな活動を示すなど、覚醒と同様のパターンを示した。

B. A. の下線部 (赤) の拡大図 (30 倍)。

両側頸二腹筋のリズミカルなバーストは、個々の刺激のパルスに対応した短潜時応答（＊）によって構成されている。

Fig. 7 レム睡眠で長時間連続刺激によって誘発した RJM の一例

- A. 刺激開始にやや遅れ、刺激側と反対側の頸二腹筋に連続した筋活動が誘発された。しかし、刺激終了後に活動は継続せず、咬筋の応答も認めなかった。

B. A. の下線部（赤）の拡大図（30倍）。

左側頸二腹筋のリズミカルなバーストは、個々の刺激のパルスに対応した短潜時応答（＊）によって構成されている。

Fig. 8 RJM の誘発率

A. 刺激強度 1.2T での誘発率 ($n=10$, mean \pm S.E.)。

安静覚醒（Wake）は、ノンレム睡眠（NREM）より有意に高く、レム睡眠（REM）では最も低かった。＊ : $P < 0.016$ 。

B. 刺激強度 2.0T での誘発率 ($n=4$, mean \pm S.E.)。

安静覚醒、ノンレム睡眠、レム睡眠の間での誘発率に有意な差を認めなかった。＊ : $P > 0.016$ 。

Fig. 9 RJM における頸二腹筋バーストの振幅

A. 上の図：誘発された RJM の左側頸二腹筋筋電図。下の図：下線部の拡大図。

バーストの振幅は、バーストを構成する複数の短潜時応答の振幅（両矢印）の平均値とした。

L-Dig : 左側頸二腹筋筋電図。

B. 刺激強度 1.2T でのバーストの振幅 ($n=10$, mean \pm S.E.)。

安静覚醒 (Wake) とノンレム睡眠 (NREM) の間には差を認めなかつたが、レム睡眠 (REM)

の振幅は有意に小さかつた。 * : $P < 0.016$ 。

C. 刺激強度 2.0T でのバーストの振幅 ($n=4$, mean \pm S.E.)。

安静覚醒、ノンレム睡眠、レム睡眠の間での振幅に有意な差を認めなかつた。

Fig. 10 RJM の誘発潜時

A. RJM の誘発潜時は両矢印の時間を計測した。

L-Dig : 左側頸二腹筋の筋電図。 ↓ : 刺激開始時。

B. 刺激強度 1.2T の誘発潜時 ($n=10$, mean \pm S.E.)。

安静覚醒 (Wake) はノンレム睡眠 (NREM) より有意に短く、レム睡眠 (REM) はノンレ

ム睡眠より有意に短かつた。しかし、安静覚醒とレム睡眠の間には差を認めなかつた。 * :

$P < 0.016$ 。

C. 刺激強度 2.0T の誘発潜時 ($n=4$, mean \pm S.E.)。

安静覚醒、ノンレム睡眠、レム睡眠の間に有意な差を認めなかつた。

Fig. 11 長時間連続刺激中に誘発された左側頸二腹筋の短潜時応答の振幅の変化。

A. 覚醒での一例。B. ノンレム睡眠での一例。C. レム睡眠での一例。

A は Fig. 5、B は Fig. 6、C は Fig. 7 での RJM の誘発例を示す。長時間連続刺激の個々の

刺激パルスに対応して出現した、短潜時応答の振幅をプロットし線で結んだ。振幅は規則的に

漸増・漸減を繰り返している。L-Dig：左側頸二腹筋の筋電図。

Fig. 12 RJM バーストのバースト周期

A. 刺激強度 1.2T でのバースト周期 ($n=10$, mean \pm S.E.)。

安静覚醒 (Wake)、ノンレム睡眠 (NREM)、レム睡眠 (REM) の間で差を認めなかった。

B. 刺激強度 2.0T のバースト周期 ($n=4$, mean \pm S.E.)。

安静覚醒、ノンレム睡眠、レム睡眠の間で差を認めなかった。

Fig. 13 刺激電極を刺入した中脳の組織像

A. 中脳下丘レベル (Bregma より尾側 13.0mm) の写真 (弱拡大)。

中脳腹側部に刺激電極の刺入痕を認める。

B. A の四角内の拡大の写真。

破線で囲んだ中脳腹側を走行する錐体路の纖維束に、組織の凝固部位 (*) を認める。

Figure 1. 錐体路へ短時間連続刺激を与えた一例

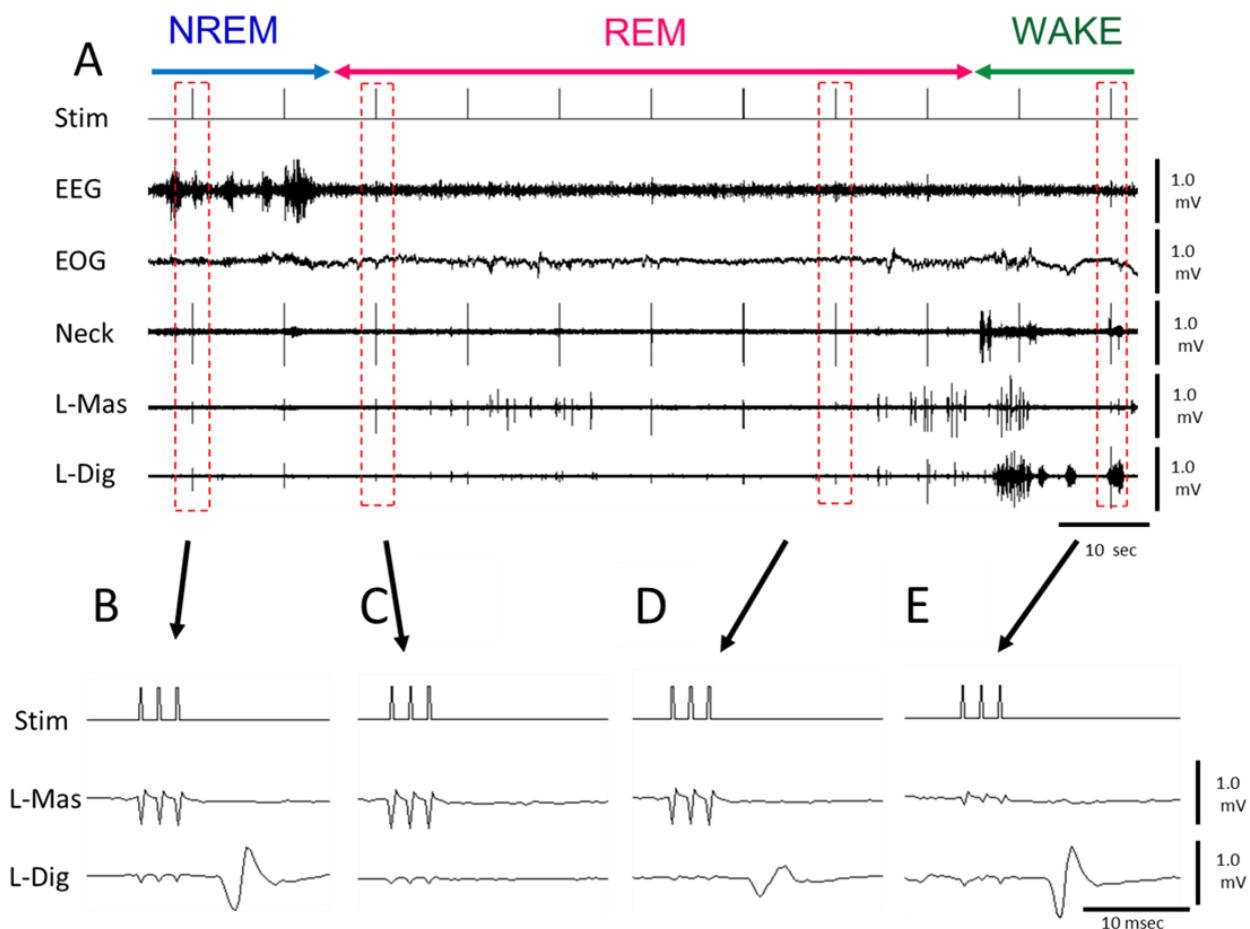


Figure 2. 短潜時応答の誘発率

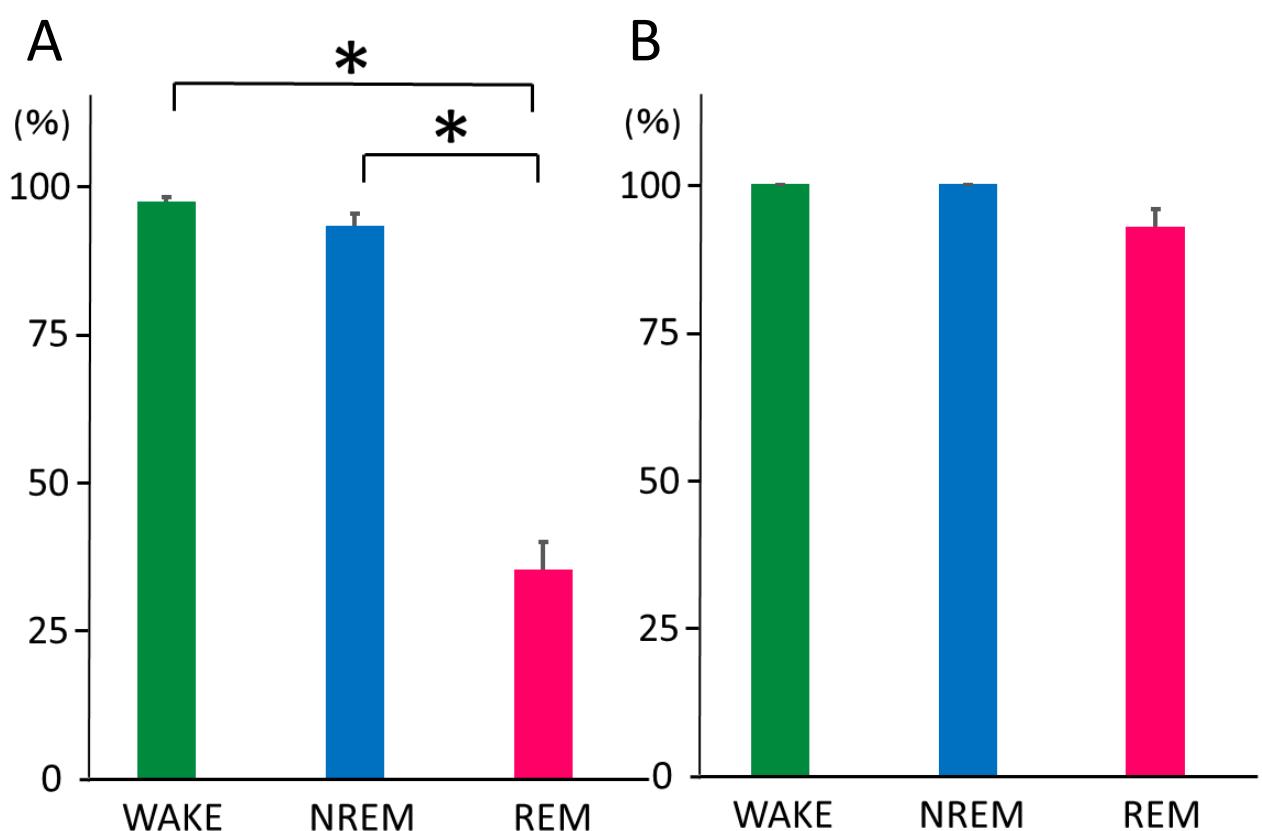


Figure 3. 短潜時応答の振幅

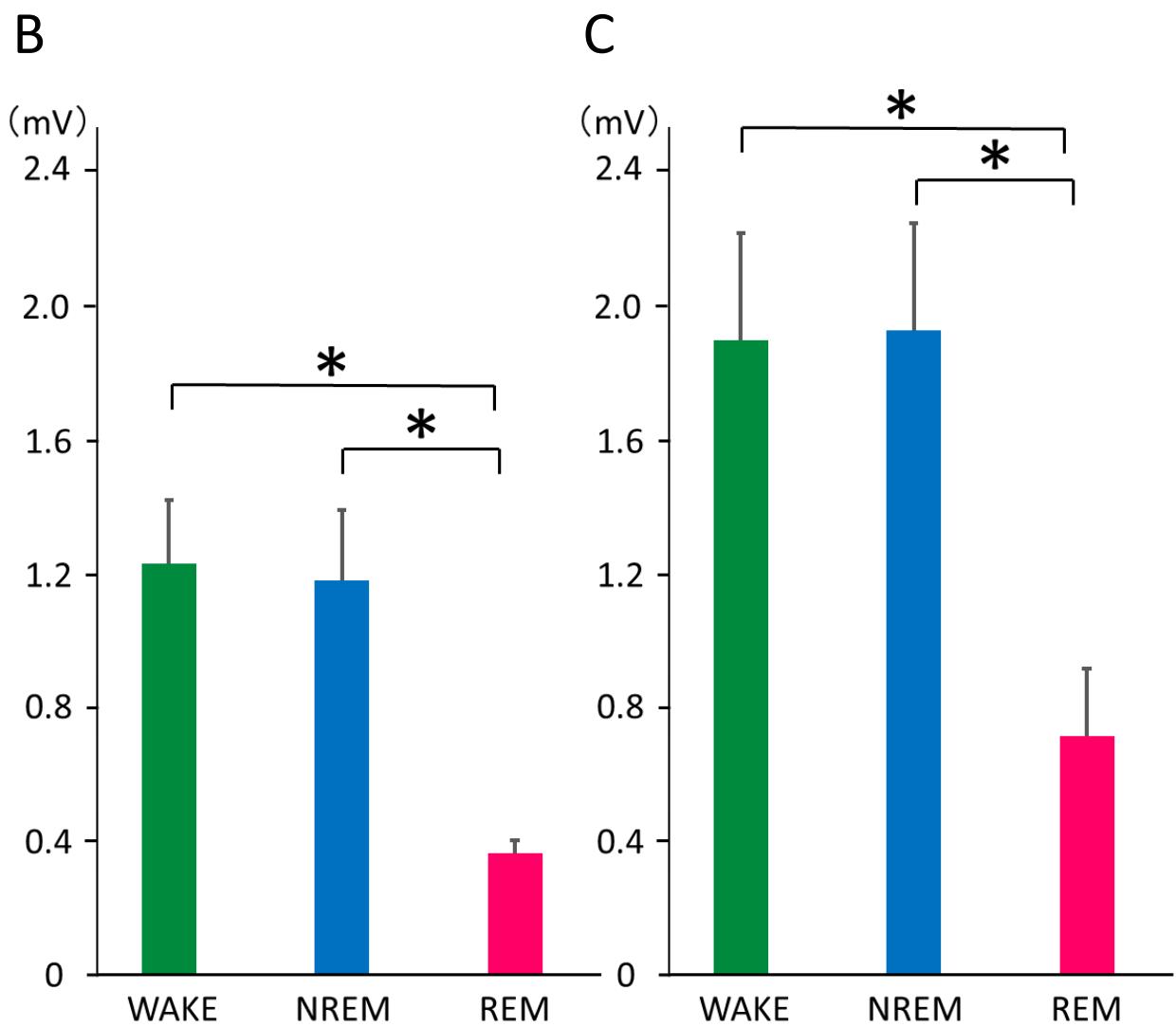
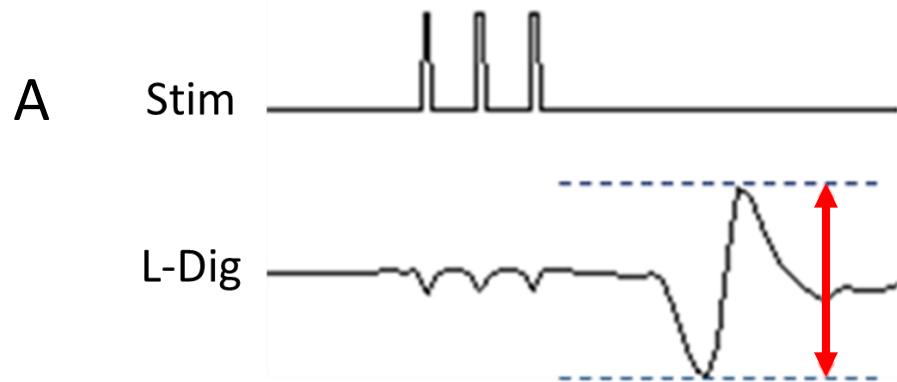


Figure 4. 短潜時応答の潜時

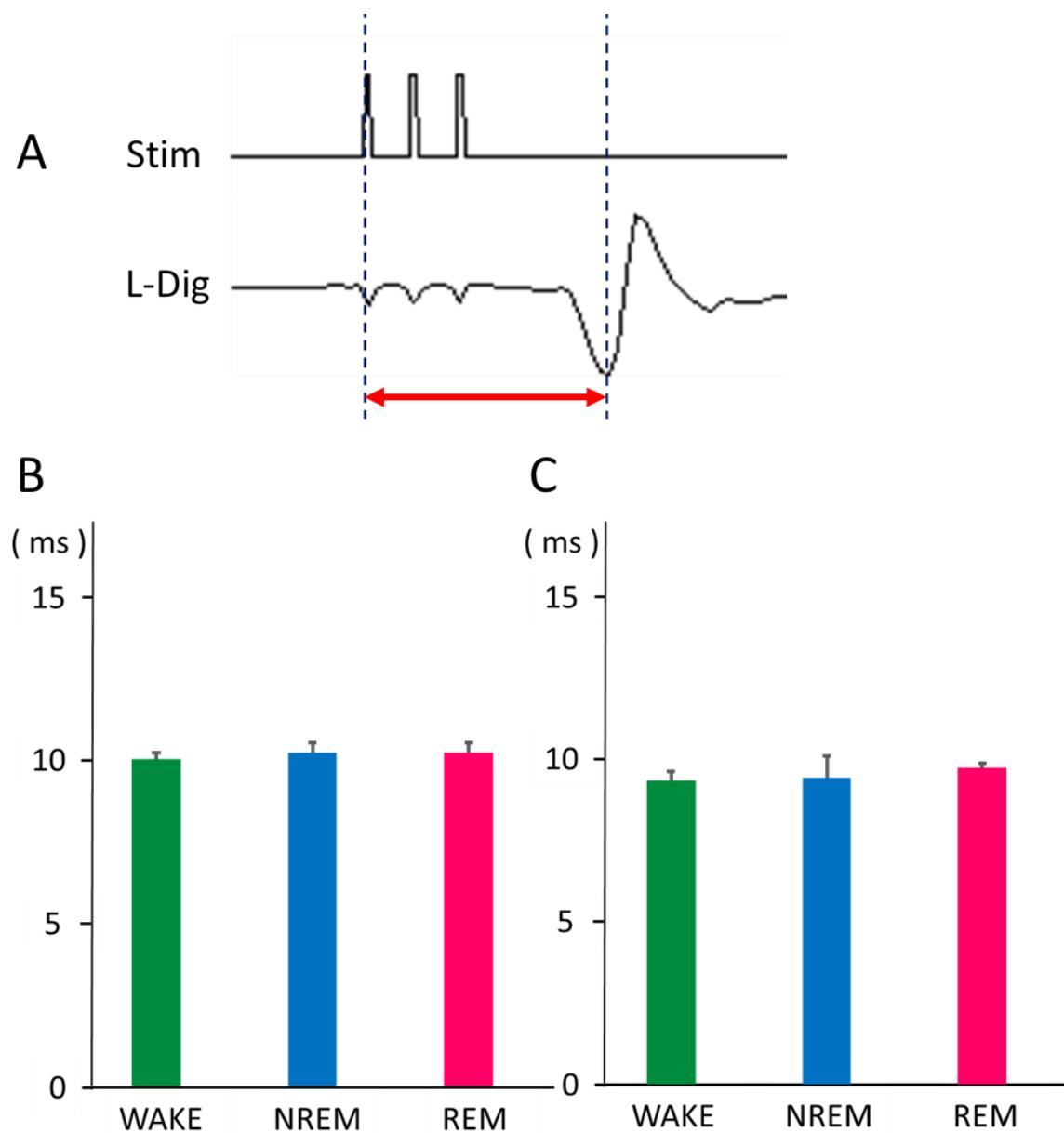


Figure 5. 安静覚醒時に長時間連續刺激によって
誘発したRJMの一例

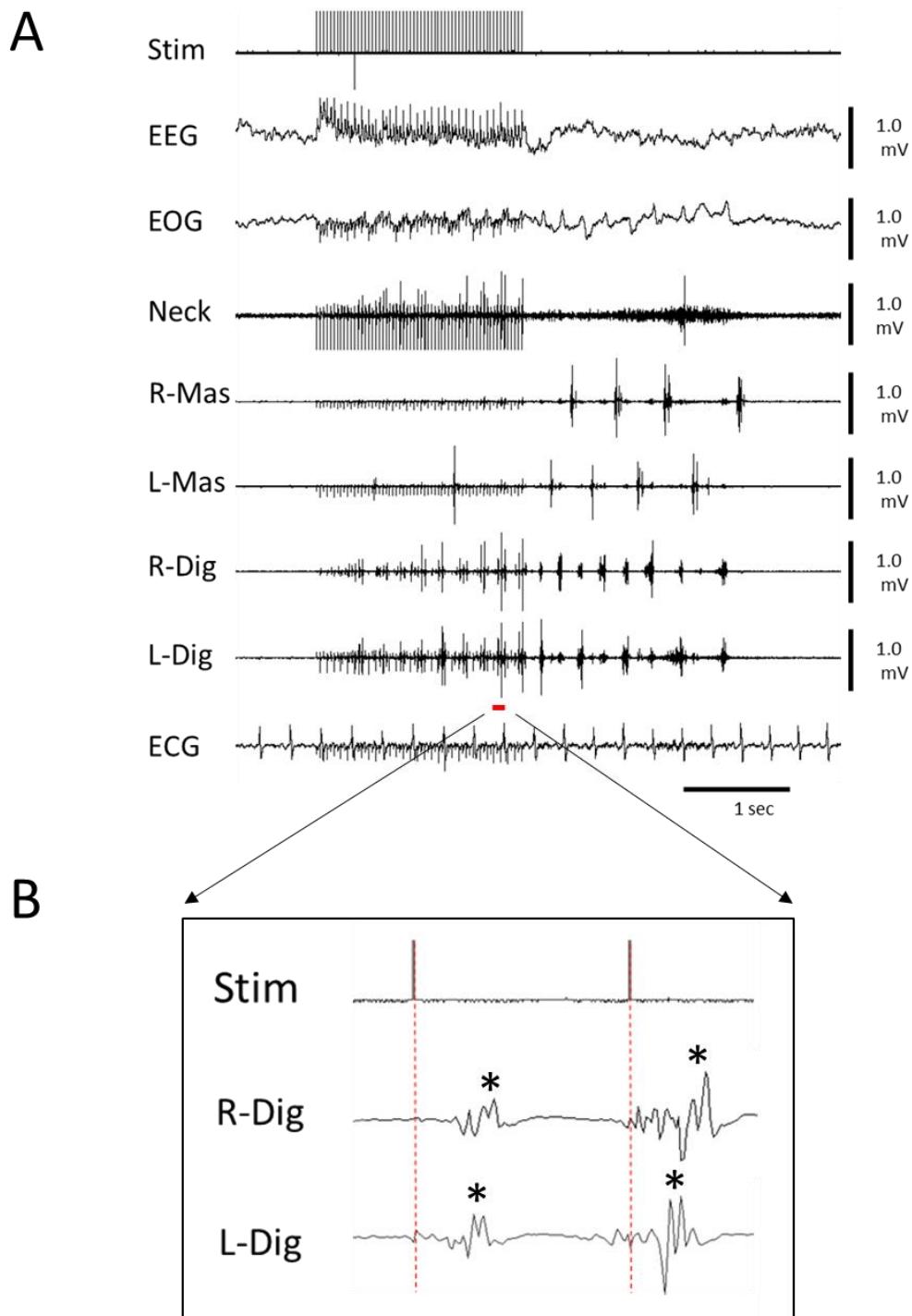
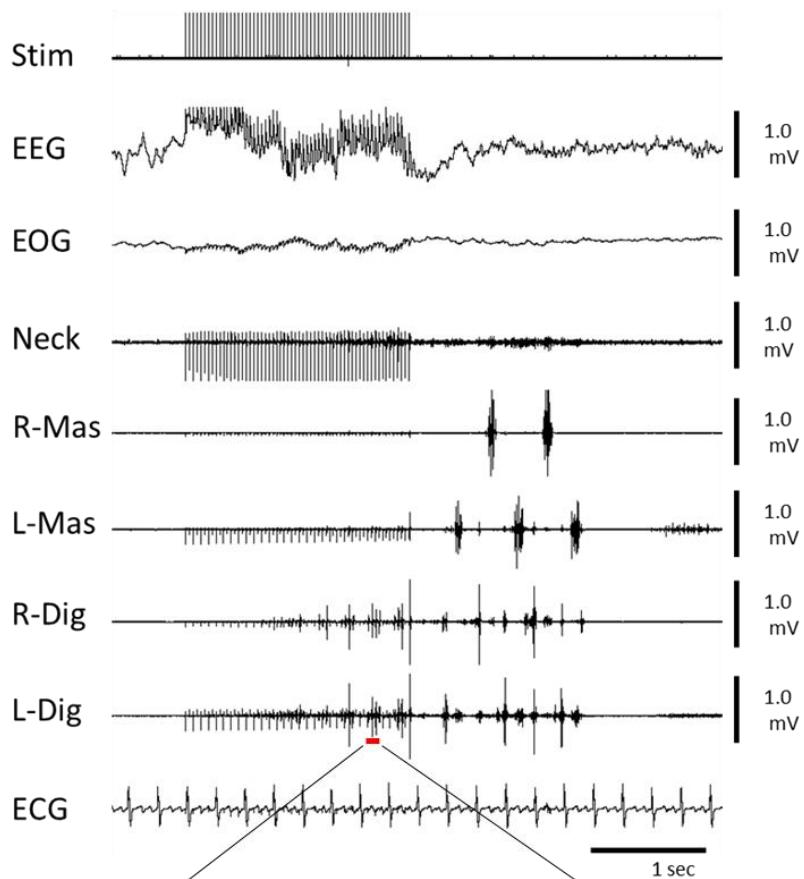


Figure 6. ノンレム睡眠で長時間連續刺激によって
誘発したRJMの一例

A



B

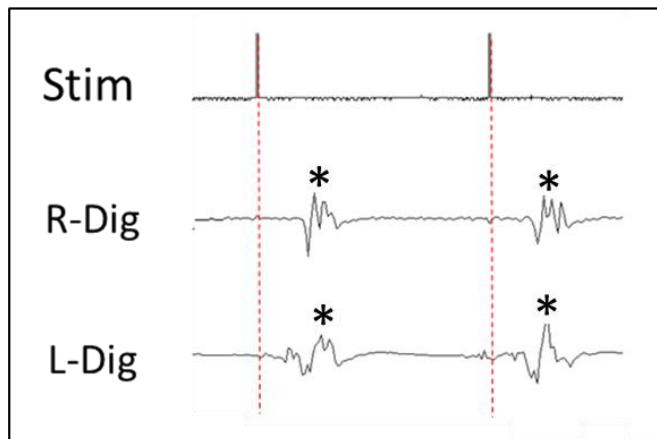
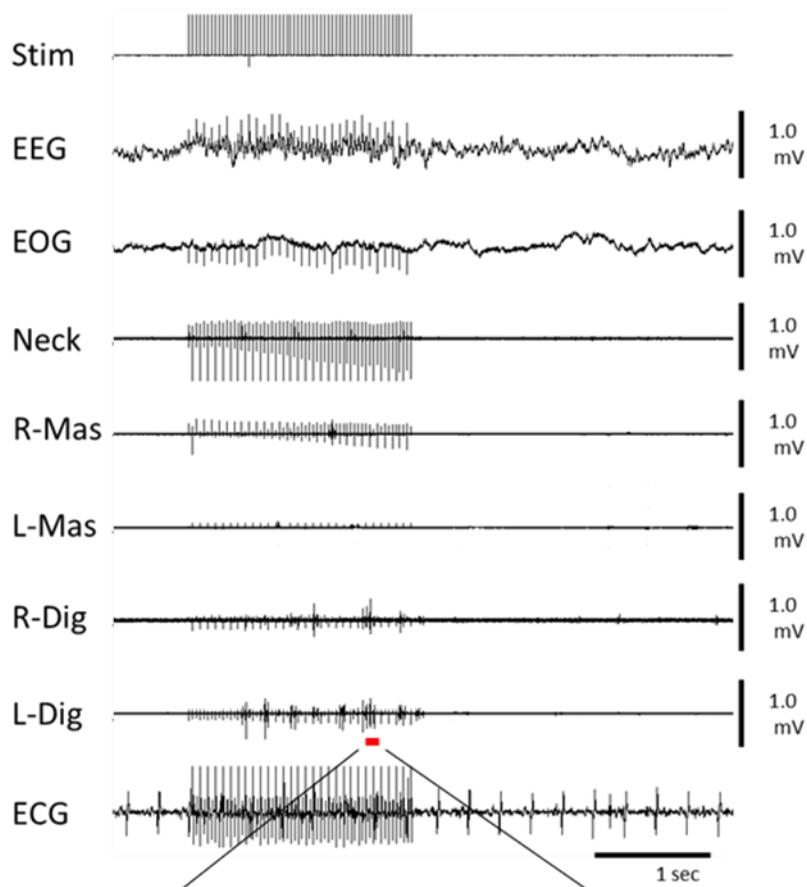


Figure 7. レム睡眠で長時間連續刺激によって
誘発したRJMの一例

A



B

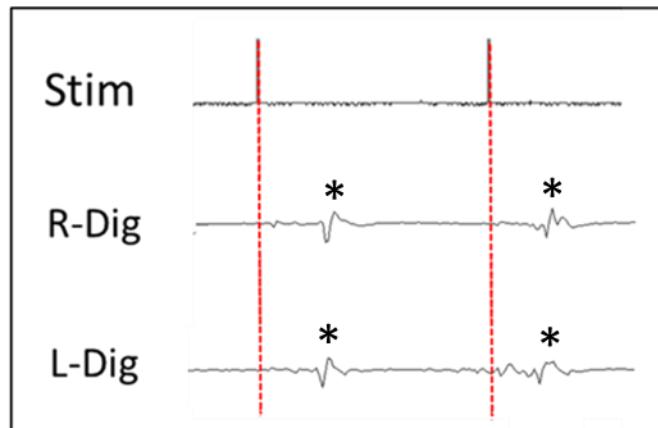


Figure 8. RJMの誘発率

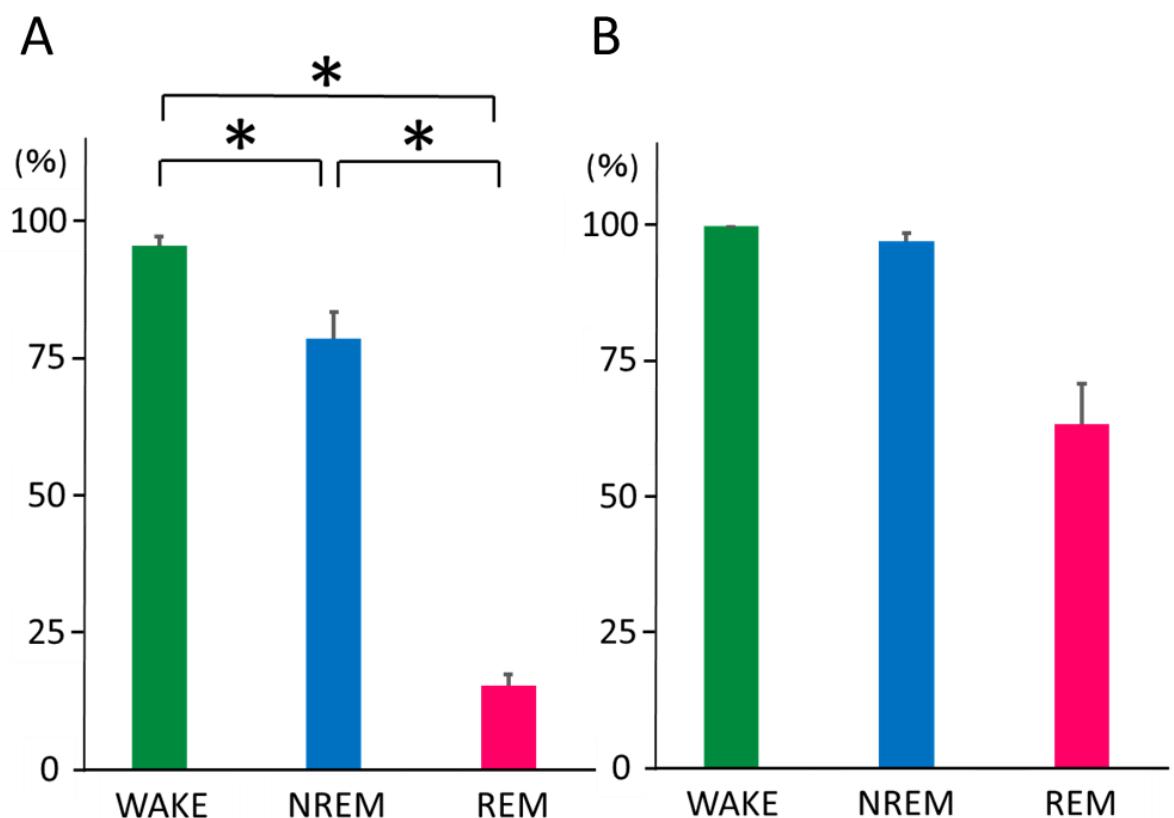


Figure 9. RJMにおける頸二腹筋バーストの振幅

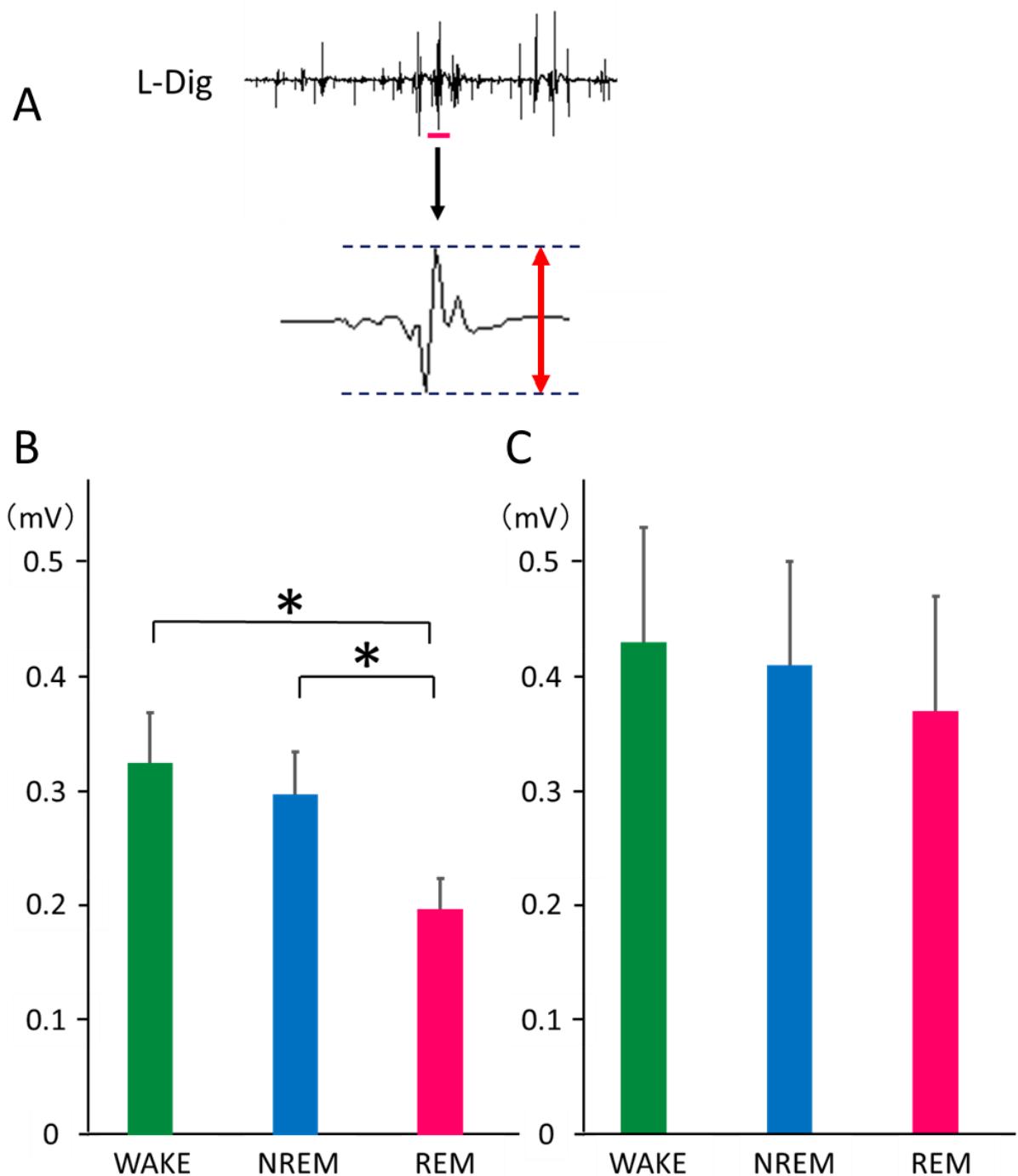


Figure 10. RJMの誘発潜時

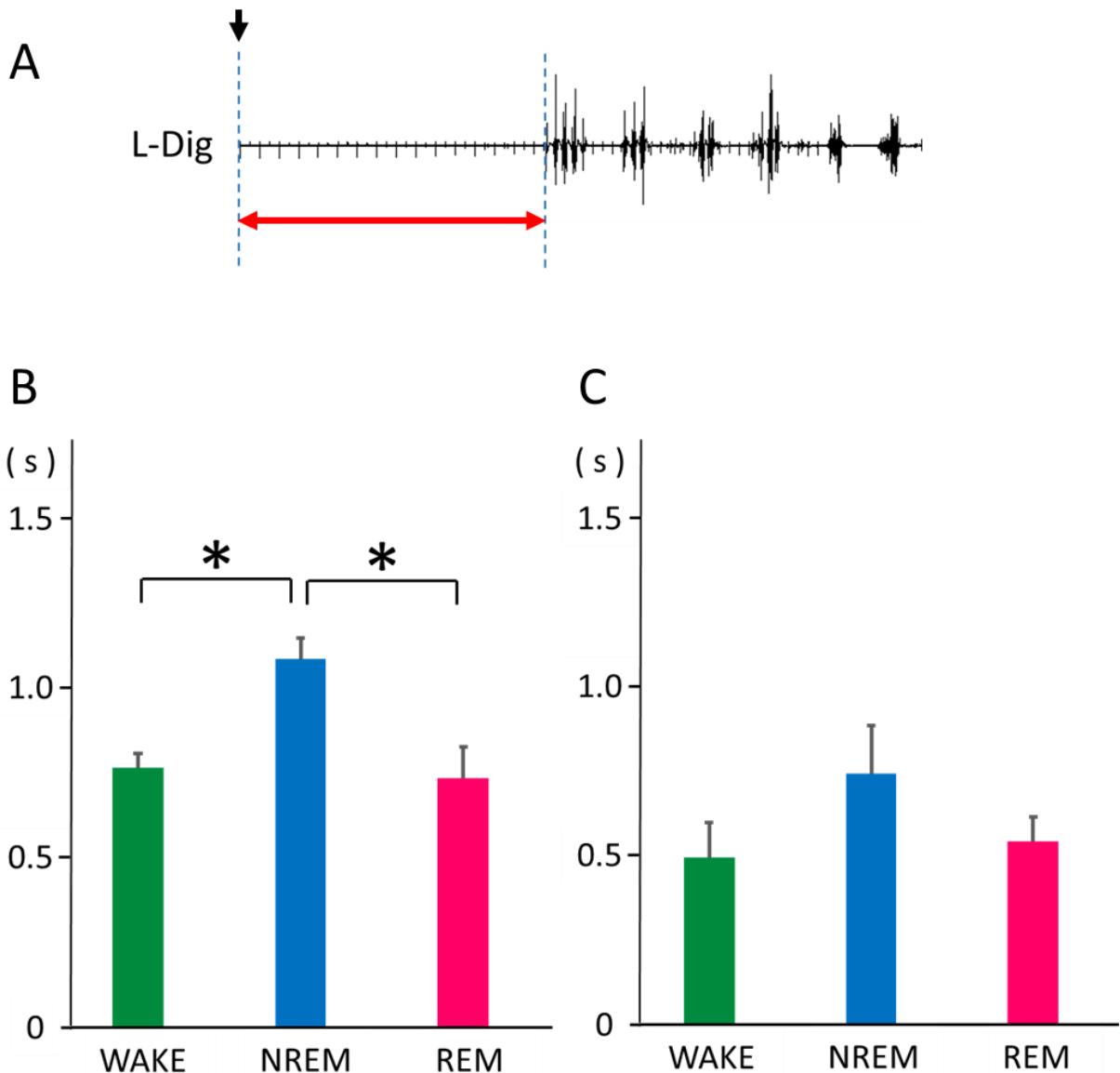


Figure 11. 長時間連続刺激中に誘発された
左側顎二腹筋短潜時応答の振幅の変化

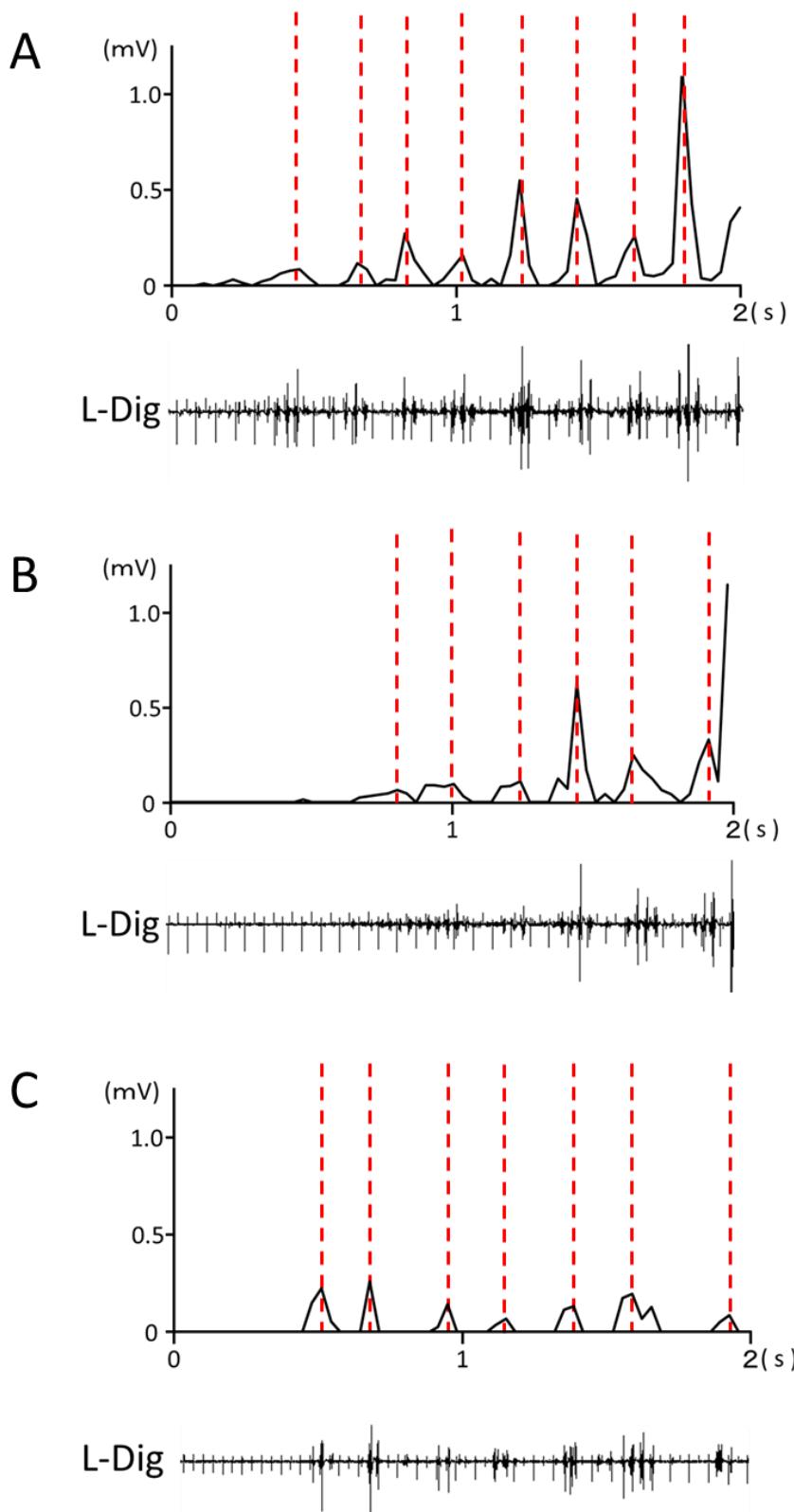


Figure 12. RJMバーストのバースト周期

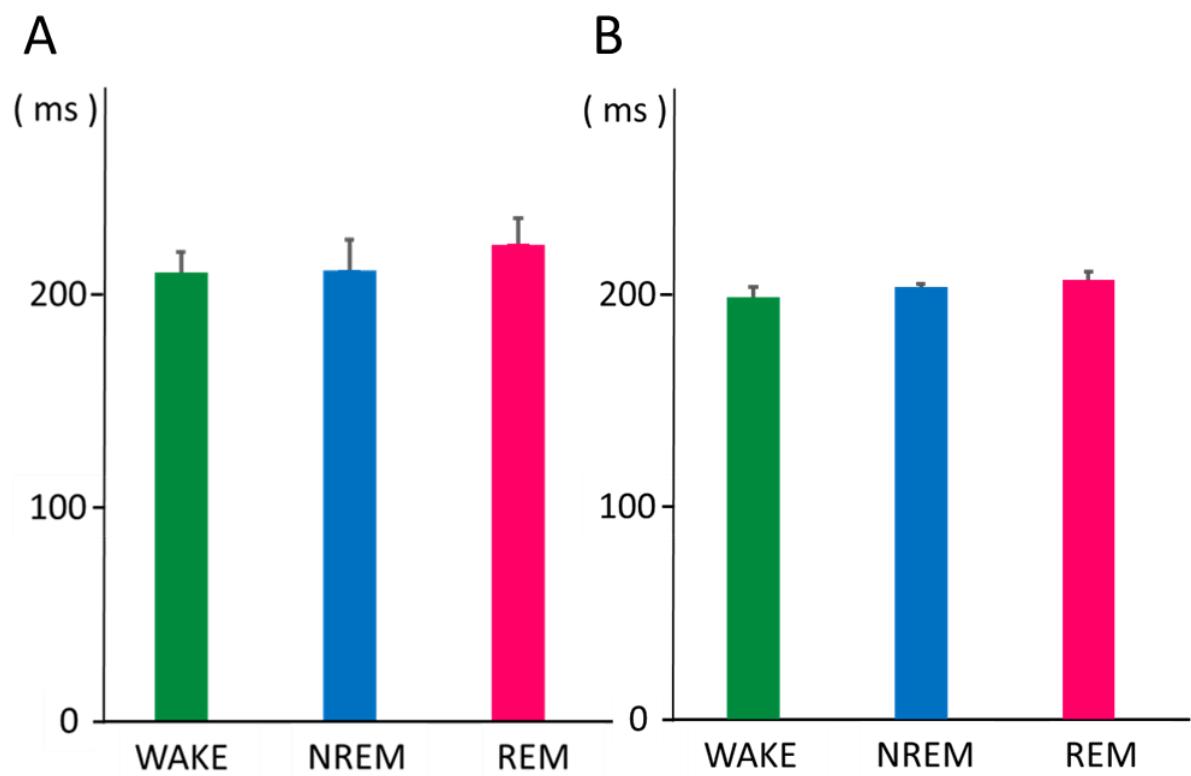
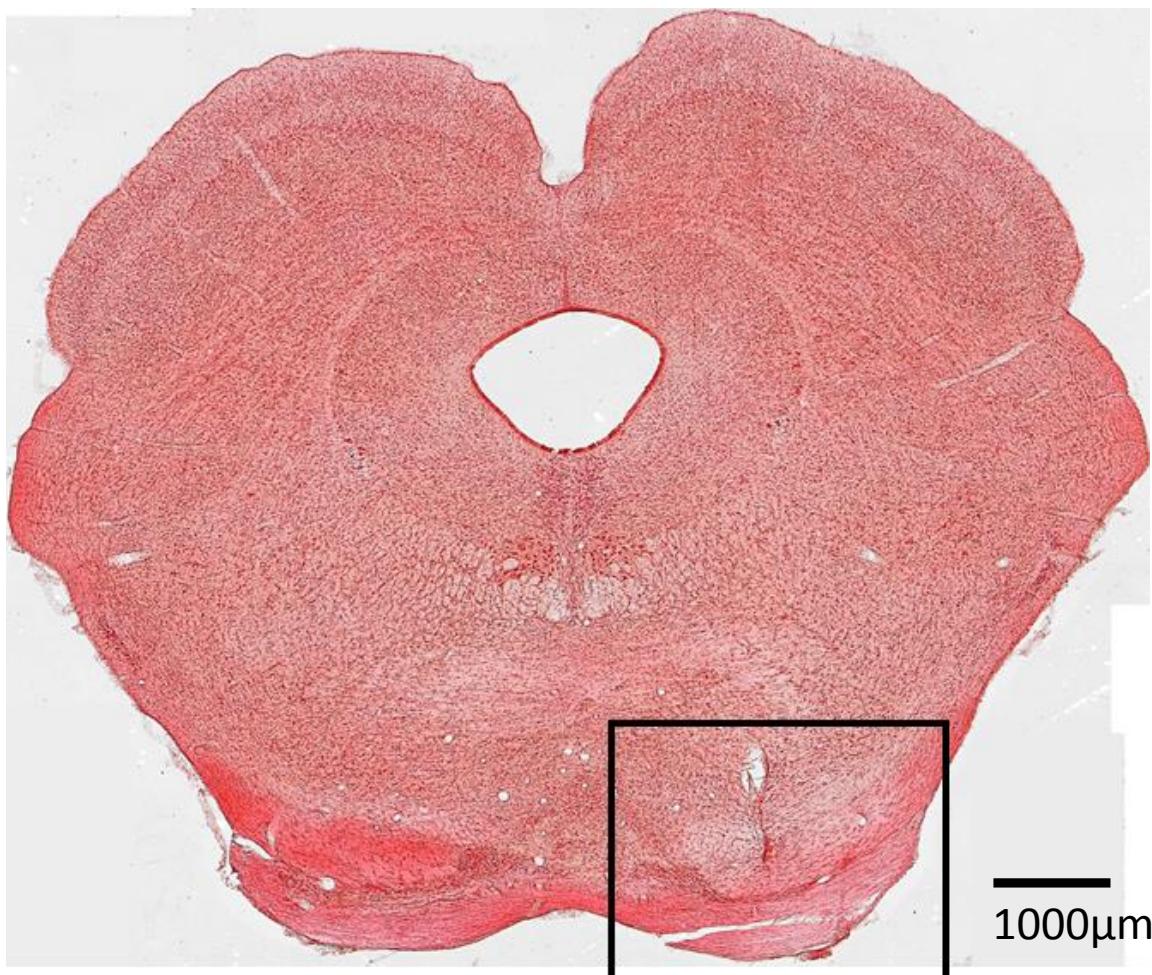


Figure 13. 刺激電極を刺入した中脳の組織像

A



B



500μm