

Title	三叉神経運動核における $\alpha$ および $\gamma$ 運動ニューロンのサイズ分布についての検討
Author(s)	森田, 由佳子
Citation	大阪大学, 2013, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/55534">https://hdl.handle.net/11094/55534</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

学位論文

三叉神経運動核における  $\alpha$  および  $\gamma$  運動ニューロンの  
サイズの分布についての検討

2013 年 3 月

大阪大学大学院歯学研究科

分子病態口腔科学専攻 顎顔面口腔矯正学教室

森田 由佳子

# 学位論文

三叉神経運動核における $\alpha$ および $\gamma$ 運動ニューロンの  
サイズの分布についての検討

2013年3月

大阪大学大学院歯学研究科

分子病態口腔科学専攻 顎顔面口腔矯正学教室

森田 由佳子



## はじめに

一つの運動ニューロンとそれによって支配される筋線維群を運動単位と呼ぶ

- 1). 筋収縮力は、運動単位の動員と運動ニューロンの発火頻度の変調という二つの方式によって調節されており、骨格筋の種類によりその寄与の度合いが異なる
- 2). 運動単位は随意的等尺性収縮の間に序列動員されることが知られており<sup>3)</sup>、その等尺性収縮中には、Ia群感覚神経線維（筋紡錘の活動を中枢に伝える求心性線維）が高い活動を示す<sup>4)</sup>。これは $\alpha$ 運動ニューロン（骨格筋を支配する運動ニューロン）が活性化され等尺性収縮が生じる際、 $\gamma$ 運動ニューロン（錘内筋を支配する運動ニューロン）も同時に活性化され錘内筋の収縮が生じるためである
- 5). Ia群感覚神経線維からのシナプス入力により $\alpha$ 運動ニューロンにおいて生じる興奮性シナプス後電流（Ia-EPSC）は、サイズの小さい運動ニューロンでは入力抵抗が大きいため、その振幅が大きく、サイズの大きい運動ニューロンに先行して活動電位発生の閾膜電位へと到達すると考えられる。こうした運動単位の序列動員はサイズの原理と呼ばれている<sup>6)</sup>。

律動的な咀嚼運動中の下顎の軌跡を咀嚼サイクルといい、これは閉口相・咬合相・開口相に分けられる<sup>7)</sup>。閉口相においては、食物の抵抗が小さいため、主働筋である咬筋の活動は比較的小さい。しかし、食物を噛みこむ咬合相では、咬筋が活発に活動し大きな張力が生じる。咬合相では下顎の垂直的位置がほとんど変化しないことから、咬筋は等尺性収縮しているとみなすことができる。こうしたヒト咬筋の随意的等尺性収縮時にも、サイズの原理にしたがった運動単位の序列動員が認められる<sup>3), 8)</sup>。咬合相における運動単位の序列動員パターンは、閉口筋

を支配する運動神経核内の運動ニューロンのサイズの分布パターンを反映したものに必ずである。

ラットの三叉神経運動核には、閉口筋を支配する運動ニューロン群と開口筋を支配する運動ニューロン群が、それぞれ、背外側および腹内側に分布している。筋紡錘は、閉口筋には存在するが、開口筋には存在しない<sup>9), 10)</sup>。そのため、三叉神経運動核の閉口筋運動ニューロン群は、その神経終末に vesicular glutamate transporter 1 (VGLUT1) を発現する Ia 感覚線維からのシナプス入力を受けるが、開口筋運動ニューロン群はそのようなシナプス入力を受けないことが免疫組織化学的手法により示された<sup>11)</sup>。開口筋を支配する運動ニューロン群のサイズの分布は単峰性を示すが、閉口筋である咬筋運動ニューロンのサイズは二峰性の分布を示し、小型細胞群の分布が閉口筋支配運動ニューロン群でのみ認められることから、小型細胞群は $\gamma$ 運動ニューロンであると想定されてきた<sup>12)</sup>。

Estrogen related receptor 3 (Err3) は、核内受容体のひとつであり<sup>13)</sup>、運動ニューロンの分化に関わる<sup>14)</sup>。筋紡錘の分化が抑制されたマウスでは、この Err3 陽性の運動ニューロンが消失したことから、Err3 が $\gamma$ 運動ニューロンを識別する分子マーカーであると考えられた<sup>14)</sup>。Friese ら<sup>14)</sup> は、マウス腰髄前角において、Err3 を発現する運動ニューロンは、運動ニューロンに一般的に発現している Neuronal Nuclei (NeuN)<sup>15)</sup> を発現しておらず、反対に、Err3 を発現していない運動ニューロンは NeuN を発現していることを見出した。そして、そうした性質を利用して、Err3 陽性/NeuN 陰性の運動ニューロンを $\gamma$ 運動ニューロン、Err3 陰性/NeuN 陽性の運動ニューロンを $\alpha$ 運動ニューロンとして分類し、それらのサイズ分布を調べた。その結果、二峰性分布の内の小型細胞群は $\gamma$

運動ニューロンで構成されていることが明らかになった。同様に、咬筋における運動ニューロンの分布の二峰性も、大型細胞群を構成する $\alpha$ 運動ニューロン群と小型細胞群を構成する $\gamma$ 運動ニューロン群によって構成されている可能性がある。

咬筋と四肢筋では、筋線維の組成が異なることが知られている。ラットの四肢の筋肉では type I fiber および type II fiber の筋線維が混在するが、咬筋筋線維は、収縮速度の速い type II fiber しか含まれない<sup>16), 17)</sup>。しかし、succinate dehydrogenase (SDH) 活性による分類では、純粋な白筋は少なく、赤筋および中間筋を含むことが報告されている<sup>18)</sup>。咬筋の筋線維において、収縮力に比例する筋線維の太さは赤筋、中間型、白筋の順に増加するが、赤筋群も白筋群もともに他の骨格筋のものに比べて小さいことがわかっている<sup>19)</sup>。咬筋においてもサイズの原理に従った等尺性収縮が生じることから、咬筋筋線維のこうした構成パターンは、それらを支配する運動ニューロン群の運動核におけるサイズの分布パターンに反映されていると考えられる。従って、三叉神経運動核咬筋支配領域の運動ニューロン群のサイズの分布パターンは脊髄や腰髄前角におけるものとは異なる可能性がある。

そこで、本研究では、この小型細胞群が単純に $\gamma$ 運動ニューロン群により構成されているのか、あるいは、 $\alpha$ 運動ニューロンと $\gamma$ 運動ニューロンの両方を含むのかを免疫組織化学的に検討した。

## 方法

本研究における実験動物は、大阪大学大学院歯学研究科等動物実験委員会の規定にしたがって取り扱われた。

### 1. 動物の固定と切片の作製

6匹の雄性の Sprague-Dawley ラット（生後 8 週齢, 体重 300-330g : 日本動物, 大阪）を, diethyl ether による吸入麻酔, および 7% (w/v) chloral hydrate (1ml/100g 体重) の腹腔内注射による麻酔の後, 心臓を介して 300ml の 5mM PBS を灌流し, 脱血した. 続いて 300ml の固定液 (3%ホルムアルデヒド, 75% ピクリン酸, 0.1M NaPB, pH 7.4) を灌流して固定した後, 脳を摘出した. 摘出した脳を 4°C の固定液内で 24 時間震盪し後固定した後, 30% (w/w) sucrose を含む PBS に 4°C で 24 時間浸漬し凍結保護を行った. 凍結保護の完了した脳ブロックから, ミクロトーム (SM2000R, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) を用いて 25 $\mu$ m 厚の冠状断脳幹切片を作製した.

### 2. 脳幹切片の多重染色

三叉神経運動核を含む厚さ 25 $\mu$ m の冠状断脳幹切片を使用し,  $\alpha$  および  $\gamma$  運動ニューロンのそれぞれのマーカーである NeuN あるいは Err3, コリン作動性ニューロンのマーカーである choline acetyltransferase (ChAT) および Ia 神経終末のマーカーである VGLUT1 の蛍光三重染色を行った. VGLUT1 を用いない明視野二重染色も行った.

## 2-1. 蛍光三重染色

三叉神経運動核を含む厚さ 25 $\mu$ m の冠状断脳幹切片を使用し、Err3/ChAT/VGLUT1 および NeuN/ChAT/VGLUT1 の蛍光三重染色を行った。まず、2% $H_2O_2$  を含む PBS において脳幹組織切片のクエンチング処理を 30 分間行った後、mouse anti-Err3 antibody (5 $\mu$ g/ml, PP-H6812-00; Perseuse Protomix) あるいは mouse anti-NeuN antibody (1 $\mu$ g/ml, MAB377; Millipore Bioscience Research Reagents, Billerica, MA, U.S.A.) , goat anti-ChAT antibody (1:100, AB144P; Millipore Bioscience Research Reagents, Billerica, MA, U.S.A.) および rabbit anti-VGLUT1 antibody (京都大学医学研究科高次脳機能形態学教室にて作製されたもの) を含む incubation buffer [0.12% (w/v)  $\lambda$ -carrageenan, 0.02% (w/v) sodium azide, 1% (v/v) normal donkey serum, 0.3% (v/v) Triton X-100 in PBS] において切片を 12 時間反応させた。

Mouse anti-Err3 antibody あるいは mouse anti-NeuN antibody に対して、biotin 標識 donkey anti-mouse IgG antibody (10 $\mu$ g/ml, 706-065-151; Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) を含む incubation buffer の中で 1 時間反応させた。次に、この biotin 標識抗体に対して 0.3% (v/v) Triton X-100 を含む PBS (PBS-X) で 50 倍希釈した avidin: biotinylated peroxidase complex (ABC; VECTASTAIN Elite ABC, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) を 1 時間反応させた。その後、TSA Cyanine 3 System (PerkinElmer, Waltham, MA, U.S.A.) と 15 分反応させ、ABC 由来のペルオキシダーゼを可視化した。Goat anti-ChAT antibody に対しては、Alexa Fluor 488 標識 donkey anti-goat IgG antibody (10 $\mu$ g/ml, A11055; Invitrogen) を、rabbit anti-VGLUT1 antibody



に対しては、Alexa Fluor 649 標識 donkey anti-rabbit IgG antibody (10 $\mu$ g/ml) を含む incubation buffer の中で 1 時間反応させて可視化した。

染色終了後、切片をスライドガラスに貼り付け封入し、共焦点レーザー顕微鏡 LSM510 で観察した。この際、Alexa Fluor 649, Cy3 および Alexa Fluor 488 をそれぞれ 633 nm, 543 nm, 488 nm のレーザー光により励起し、660–788 nm, 560–615 nm, 505–530 nm のバンドパスフィルターを用いて蛍光を検出し (図 1) , 10 倍, 40 倍および 63 倍の対物レンズを通して撮影した。

## 2-2. 明視野二重染色

三叉神経運動核を含む厚さ 25 $\mu$ m の冠状断脳幹切片を使用し、Err3/ChAT および NeuN/ChAT の明視野二重染色を行った。まず、脳幹組織切片のクエンチング処理を 30 分間行った後、mouse anti-Err3 antibody (5 $\mu$ g/ml) あるいは mouse anti-NeuN antibody (1 $\mu$ g/ml) および goat anti-ChAT antibody (1:100) を含む incubation buffer において切片を 12 時間反応させた。

Mouse anti-Err3 antibody あるいは mouse anti-NeuN antibody に対して、biotin 標識 donkey anti-mouse IgG antibody (10 $\mu$ g/ml) を含む incubation buffer の中で 1 時間反応させた。次に、この biotin 標識抗体に対して PBS-X で 50 倍希釈した ABC を 1 時間反応させた。その後、DAB-Ni (0.02%DAB, 10mM Nickel ammonium sulfate, 0.0001% $H_2O_2$ , および 50mM Tris-HCl(pH 7.6)) と 15 分反応させ、ABC 由来のペルオキシダーゼを黒色に可視化した。続いて、Goat anti-ChAT antibody に対しては、biotin 標識 donkey anti-goat IgG antibody (10 $\mu$ g/ml, AP180B; Millipore) および 10% normal mouse serum (0.02%  $NaN_3$ ) を含む incubation buffer の中で 1 時間反応させた。次に、この biotin 標

識抗体に対して PBS-X で 50 倍希釈した ABC を 1 時間反応させた後, TAPM (Tris-aminophenylmethane) (0.1% TAPM, 0.07% p-cresol, 0.002% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> および 50mM Tris-HCL (pH7.6) ) と 30 分反応させ, ABC 由来のペルオキシダーゼを赤色に可視化した. 染色終了後, 切片をスライドガラスに貼り付け封入し, 10 倍および 40 倍の対物レンズを通して撮影した.

### 3. 細胞体サイズの計測方法

蛍光染色した切片標本を共焦点顕微鏡 LSM ( Carl Zeiss MicroImaging Co., Ltd. ) を用いて, また, 明視野染色した切片標本を光学顕微鏡を用いて観察・撮影し, 三叉神経運動核内の閉口筋および開口筋運動ニューロン群それぞれについて, ChAT/Err3 染色では, ChAT 単独陽性のニューロンを  $\alpha$  運動ニューロン, ChAT および Err3 共陽性のニューロンを  $\gamma$  運動ニューロンとして同定し, 一方, ChAT/NeuN 染色では ChAT および NeuN 共陽性のニューロンを  $\alpha$  運動ニューロン, ChAT 単独陽性のニューロンを  $\gamma$  運動ニューロンと同定した. 取得した画像より Neurolucida ( MicroBrightField Japan, Inc. ) を用いて, 各運動ニューロンの核小体を確認できる Z 軸の断面において, 細胞の輪郭をトレースし, 細胞体断面積, 短径および長径を計測した. 短径と長径の積の square root を算出し, これを細胞体径とした. 計測した細胞体断面積および細胞体径についてヒストグラムを作成した.

## 研究成績

### 免疫染色像

蛍光三重染色 (ChAT/Err3/VGLUT1) および明視野二重染色 (ChAT/Err3) を行った切片の弱拡大像を、図 2 に示す。蛍光三重染色を行った切片では、三叉神経運動核の背外側領域には VGLUT1 の発現が強く、これに対して腹内側領域には VGLUT1 の発現がほとんど認められなかった (図 2A および B)。ラットの咬筋を支配している運動ニューロンは、VGLUT1 発現領域である三神経運動核背外側部に位置する<sup>20), 21)</sup>。したがって、背外側の運動ニューロン群を閉口筋運動ニューロン群、腹内側の運動ニューロン群を開口筋運動ニューロン群とした。そのニューロン群の解剖学的な局在の特徴は、明視野の二重染色を行った切片を観察した場合と一致していた (図 2A および C)。

次いで、蛍光三重染色を行った切片の強拡大像を図 3-6 に、明視野二重染色を行った切片の強拡大像を図 7 に示す。図 3 および 4 は ChAT/Err3/VGLUT1 の三重染色の結果である。図 3A と 3B および 4A と 4B は、それぞれ同じ視野の Z 軸を前者は 2 $\mu$ m、後者は 1 $\mu$ m だけ変えた断面の撮影像であり、細胞の核小体が観察される断面である。図 3A と 3B に示した切片標本では、比較的小型の Err3 陽性  $\gamma$  運動ニューロンが比較的大型の Err3 陰性  $\alpha$  運動ニューロンと混在していた。しかし、他の切片標本では、Err3 陽性の  $\gamma$  運動ニューロン (図 4A) と、これと同等のサイズを有する Err3 陰性の  $\alpha$  運動ニューロン (図 4B) を認めた。このように、 $\gamma$  運動ニューロンと同等の大きさを示す  $\alpha$  運動ニューロンが存在する可能性が明らかとなった。

図 5 および 6 は ChAT/NeuN/VGLUT1 の三重染色の結果である。図 6A および 6B は、同じ視野の Z 軸を 1 $\mu$ m だけ変えた断面の撮影像であり、細胞の核小体が観察される断面である。NeuN 陰性の  $\gamma$  運動ニューロン (図 5 および図 6B) と、これと同等あるいは、より小さいサイズを有する NeuN 陽性の  $\alpha$  運動ニューロンを認めた (図 5 および図 6A) 。このように、Err3 および NeuN の標識法を併用することにより、 $\gamma$  運動ニューロンと同等、あるいは、より小さいサイズを有する  $\alpha$  運動ニューロンが存在することが明確に示された。

同様の実験を明視野二重染色法によっても行った。図 7 の A および B に示したように、ChAT 陽性/Err3 陽性の  $\gamma$  運動ニューロン (A, arrow) と同等のサイズを有する ChAT 陽性/Err3 陰性の  $\alpha$  運動ニューロン (B, arrow head) が認められた。また、図 7 の C および D に示したように、ChAT 陽性/NeuN 陰性の  $\gamma$  運動ニューロン (C, arrow) と同等のサイズを有する ChAT 陽性/NeuN 陽性の  $\alpha$  運動ニューロン (D, arrow head) が認められた。

### 細胞体サイズの分布

各運動ニューロン群の細胞体断面積の分布を図 8 および 9 に、細胞体径の分布を図 10 および 11 に示す。

図 8 の A および B のグラフは ChAT/Err3 染色を、C および D のグラフは ChAT/NeuN 染色を行った場合のラット三叉神経運動核 閉口筋および開口筋支配運動ニューロンの ChAT 陽性細胞の断面積の分布を示す。ChAT/Err3 染色および ChAT/NeuN 染色のいずれの場合も、閉口筋支配運動ニューロンの断面積の分布パターンは二峰性の分布を示したが、断面積の小さいグループが、より高いシャープなピークを示した (図 8A および 8C) 。開口筋支配運動ニューロンの断面

積の分布パターンは、閉口筋で認められたようなシャープなピークを認めなかった（図 8B および 8D）． 図 10 の A および B のグラフは ChAT/Err3 染色を， C および D のグラフは ChAT/NeuN 染色を行った場合のラット三叉神経運動核 閉口筋および開口筋支配運動ニューロンの ChAT 陽性細胞の細胞体径の分布を示す． 図 8 と同様の所見を認め， 閉口筋運動ニューロン群の細胞体径の分布パターンは二峰性の分布を示すが， 細胞体径の小さいグループが， より高いシャープなピークを示した（図 10 の A および C）． 開口筋支配運動ニューロンの細胞体径の分布パターンは， 閉口筋で認められたようなシャープなピークを認めなかった（図 10 の B および D）．

ラット閉口筋の  $\alpha$  および  $\gamma$  運動ニューロンの細胞体サイズの分布について

図 9 の A および B のグラフは ChAT/Err3 染色を， C および D のグラフは ChAT/NeuN 染色を行った場合のラット三叉神経運動核 閉口筋支配領域の  $\alpha$  および  $\gamma$  運動ニューロンの ChAT 陽性細胞の細胞体断面積の分布を示す． いずれのグラフも， グレーのヒストグラムは閉口筋領域における全ての ChAT 陽性運動ニューロンの分布を示し， そのうち赤で示されたグループは， A のグラフでは ChAT 陽性/Err3 陰性， B のグラフでは ChAT 陽性/Err3 陽性の運動ニューロン群の分布を， 青で示されたグループは， C のグラフでは ChAT 陽性/NeuN 陽性， D のグラフでは ChAT 陽性/NeuN 陰性の運動ニューロンの分布を示す． ChAT 陽性/Err3 陰性および ChAT 陽性/NeuN 陽性の運動ニューロンはいずれも， 広範囲かつ bimodal な分布を示した（図 9 の A および C）． これに対して， ChAT 陽性/Err3 陽性および ChAT 陽性/NeuN 陰性の運動ニューロンは， 単峰性の分布を示し， そのピークはそれぞれ小型の ChAT 陽性/Err3 陰性および ChAT 陽性/NeuN 陽性の

運動ニューロン群のピークとほぼ同じ ( $200\sim 260\mu m^2$ ) であった (図 9 の B および D) .

図 11 の A および B のグラフは ChAT/Err3 染色を, C および D のグラフは ChAT/NeuN 染色を行った場合のラット三叉神経運動核 閉口筋支配領域の  $\alpha$  および  $\gamma$  運動ニューロンの ChAT 陽性細胞の細胞体径の分布を示す. 図 9 と同様の所見を認め, ChAT 陽性/Err3 陰性および ChAT 陽性/NeuN 陽性の運動ニューロンはいずれも, 広範囲かつ bimodal な分布を示した (図 11 の A および C) . これに対して, ChAT 陽性/Err3 陽性および ChAT 陽性/NeuN 陰性の運動ニューロンは, 単峰性の分布を示し, そのピークはそれぞれ小型の ChAT 陽性/Err3 陰性および ChAT 陽性/NeuN 陽性の運動ニューロン群のピークとほぼ同じ ( $16\sim 22\mu m$ ) であった (図 11 の B および D) .

図 9 および 11 より, 閉口筋運動ニューロン群における  $\alpha$  運動ニューロンの細胞体サイズの分布は二峰性を示すのに対して,  $\gamma$  運動ニューロンは単峰性を示した. 小型の  $\alpha$  運動ニューロン群分布のピークと  $\odot$  運動ニューロン群分布のピークはほぼ同じであることが明らかになった.

図 8 および図 10 より, ラット閉口筋の ChAT 陽性ニューロンのうち大型群の細胞体断面積のヒストグラムは, 細胞体径のそれよりもより広い分布を示した. これは, 細胞径が大きい程, 断面積はその 2 乗に比例して増加するため, 断面積の増加割合が大きくなるからであると考えられる.



## 全運動ニューロン中における $\gamma$ 運動ニューロンの占有率

閉口筋領域の ChAT 陽性全運動ニューロン群のうち、 $\gamma$ 運動ニューロンと想定されるニューロンの割合は、ChAT/Err3 の染色では 34.7%、ChAT/NeuN の染色では 35.8%であった（図 9 および 10）。

## 考察

ヒトは食物を咀嚼するとき、味と同時にその硬さを感じて噛む力を調節しているが、あまりにも容易にできているため、その巧妙さを意識することはほとんどない。しかしながら、咀嚼運動は出生直後からの年単位の学習の結果成立している極めて精密な運動であり、高次脳機能により実現されていると考えられる。ラットは、出生直後から吸啜運動を開始し、吸啜から咀嚼運動への移行は生後 12 日前後に行われる<sup>22),23)</sup>。こうした発達過程で、咀嚼筋線維およびそれらを支配する運動ニューロンの分化発達が並行して生じると考えられる。運動ニューロンの分化に関わると考えられる因子として、the zinc-finger transcription factor である Egr3 や、the ETS transcription factors である Pea3 および Er81 があり、これらは錘内筋に選択的に発現している<sup>24)-26)</sup>。運動ニューロンの分化に関わる転写因子の一つである Estrogen related receptor 3 (Err3) は、核内受容体のひとつである<sup>13)</sup>。Friese (2009) ら<sup>14)</sup>は、上述したようにマウス腰髄前角において、Err3 を発現する運動ニューロンは、運動ニューロンに一般的に発現している Neuronal Nuclei (NeuN)<sup>15)</sup>を発現しておらず、反対に、Err3 を発現していない運動ニューロンは NeuN を発現していることを発見した。また、筋紡錘の分

化を抑制されたマウスでは、この Err3 陽性/NeuN 陰性の運動ニューロンが消失したことから、Err3 が  $\gamma$  運動ニューロンを識別する分子マーカーであるとした。これにより、Err3 陽性/NeuN 陰性の運動ニューロンを  $\gamma$  運動ニューロン、Err3 陰性/NeuN 陽性の運動ニューロンを  $\alpha$  運動ニューロンと識別することが可能となった。

これまでに三叉神経運動核の運動ニューロンのサイズの分布について検討した研究はいくつかある。しかし、その多くは HRP (horse radish peroxidase) の逆行性標識法を用いたものであり、Friese ら<sup>14)</sup>の報告まで、 $\alpha$  および  $\gamma$  運動ニューロンを分子生物学的に区別する方法がなく、それぞれ形態学的に前者が大型の細胞体を持ち、後者が小型の細胞体を持つという特徴で区別されてきた。そこで、本研究では、生後 8 週齢のラットを対象として、三叉神経運動核の運動ニューロンを、Err3 および NeuN という相補的な分子マーカーにより、組織学的に識別することを試みた。

本研究から得られた三叉神経運動核閉口筋領域に存在する運動ニューロンの細胞体面積の分布と、先行研究<sup>13)</sup>で報告されているマウス腰髄に存在する運動ニューロンの細胞体面積の分布を比較検討した。その結果、三叉神経運動核閉口筋領域に存在する運動ニューロンは、腰髄のそれと比較して、小細胞群にも  $\alpha$  運動ニューロンが存在するという傾向、および、全運動ニューロン群の中で  $\gamma$  運動ニューロンが占有する割合が高いという傾向が認められた。以下、それぞれの詳細について述べる。

## ラット閉口筋 $\alpha$ 運動ニューロンの分布について

マウス腰髄の運動ニューロンでは二峰性分布における小型細胞群はほぼ  $\gamma$  運動ニューロンで占められているのに対して、ラット閉口筋運動ニューロン群の二峰性分布における小型細胞群は、 $\alpha$  運動ニューロンと  $\gamma$  運動ニューロンの両方を含み、 $\alpha$  運動ニューロンの幅広い分布様相が観察される。

骨格筋筋線維は、収縮速度と関連する myosin heavy chain isoform の subtype から、遅筋である type I fiber と速筋である type II fiber に分類される。さらに、ATPase 活性は収縮速度の指標として用いられ、その活性が高い筋線維は収縮速度に優れる。他方、筋活動の持久性の観点からも分類が可能である。筋線維に含まれるミオグロビンの量の違いによって、ミオグロビンを多く含み酸素を利用した高いエネルギー再生機構を有し持久性に優れる赤筋、ミオグロビンの量が少なく持久性の低い白筋に分類される。また、ミトコンドリア量はミオグロビンの量に比例することから、その違いによっても持続的にエネルギーを産生できる遅筋と、できない速筋とに分類される。さらに、SDH 活性は酸化系代謝能力の指標となり、活性が高いほど、好氣的なエネルギー産生が行われる。このように、筋線維は、多様な観点から分類することができる。

ラットの四肢の筋肉では type I fiber および type II fiber の筋線維が混在するが、ラット咬筋の筋線維を ATPase 活性の反応の高さで分類すると、その全てが ATP 反応に対して強い反応を示す、つまり速筋である type II fiber で構成されていると報告されている<sup>16),17)</sup>。一方、この咬筋の type II fiber は、SDH 活性による分類では、純粋な白筋は少なく、赤筋および中間筋を含むことが報告されている<sup>18)</sup>。つまり、咬筋筋線維は、収縮速度の速い type II fiber しか含まれないにもかかわらず、幅広い SDH 活性を有するという特徴を持つ。咬筋の筋線維にお

いて、収縮力に比例する筋線維の太さは赤筋，中間型，白筋の順に増加するが，赤筋群も白筋群もともに他の骨格筋のものに比べて小さいことがわかっている<sup>19)</sup>。サイズの原理から考察すると，小型細胞群に分布する $\alpha$ 運動ニューロンは筋線維径の小さい赤筋線維を支配し，大型細胞群に分布する $\alpha$ 運動ニューロンは筋線維径の大きい白筋線維あるいは中間筋を支配するものと考えられる。つまり，咬筋の等尺性収縮調節は，サイズの原理に基づいた運動単位の序列動員により，微小な強さから大きな強さまで広範囲かつ緻密に遂行されていることを示唆する。

#### 全運動ニューロン中における $\gamma$ 運動ニューロンの占有率

次に，三叉神経運動核閉口筋領域に存在する全運動ニューロン中の $\gamma$ 運動ニューロンの占有率を，腰髄のそれと比較する。腰髄の運動ニューロン群における $\gamma$ 運動ニューロンの占める割合は約30%である<sup>14)</sup>のに対して，閉口筋運動ニューロン群におけるそれは，ChAT/Err3の染色では34.7%，ChAT/NeuNの染色では35.8%であり，閉口筋運動ニューロン群における， $\gamma$ 運動ニューロンの占める割合は，四肢筋のそれよりも大きいことが分かった。このことを組織形態学的に考察すると，閉口筋において， $\gamma$ 運動ニューロンが支配する筋紡錘の数あるいは筋紡錘を構成する錐内筋の数が，他の骨格筋よりも多いことが示唆される。

実際，咬筋では他の骨格筋と比較して，筋紡錘の分布密度が多いことが知られている。咬筋では $1\text{cm}^2$ あたりの筋紡錘の数は，咬筋では25であるのに対して，上腕二頭筋では20である<sup>27)</sup>。この所見は三叉神経運動核閉口筋領域での $\gamma$ 運動ニューロンの占有率が高いことを支持する。

ヒトの四肢筋に存在する筋紡錘には、筋紡錘ひとつ当りに含まれる錘内筋線維が精々10本まであり、それに対してヒトの咬筋の筋紡錘には最大36本の錘内筋線維が含まれることが明らかとなっている<sup>28)</sup>。錘内筋を機能により分類すると、動的核袋線維 bag1 fiber, 静的核袋線維 bag2 fiber および核鎖線維 chain fiber に分類される。これらの錘内筋を支配する $\gamma$ 運動ニューロンもまた、その機能によって、bag1 fiber を支配し、筋紡錘の動的な反応性を調節する動的 $\gamma$ 運動ニューロンと、bag2 fiber および chain fiber を支配し、静的調節を行う静的 $\gamma$ 運動ニューロンに分類される<sup>29)</sup>。これまでにヒトの一つの筋紡錘に含まれる各錘内筋線維の平均本数を調べた報告があり、咬筋では bag1 fiber が約4本、bag2 fiber が約1.5本、chain fiber が約3.4本である<sup>30)</sup>のに対して、上腕二頭筋では、bag1 fiber が約1.6本、bag2 fiber が約1.3本、chain fiber が約3.5本である<sup>31)</sup>と報告されている。他の骨格筋と比較して咬筋の方が、bag1 fiber の数が多いことがわかる。Bag1 fiber, bag2 fiber および chain fiber を支配する静的および動的 $\gamma$ 線維の働きが知られており<sup>32)</sup>、機能が異なる錘内筋は、異なる $\gamma$ 運動ニューロンから支配を受ける可能性が高い。しかし、機能が同じ複数の錘内筋が同一の $\gamma$ 運動ニューロンから支配を受けるかどうかは不明であり、また、一つの $\gamma$ 運動ニューロンが複数の筋紡錘を支配する可能性もある。このように、 $\gamma$ 運動ニューロンによる筋紡錘の支配様式の詳細は明らかではないが、一般論として、筋紡錘内の錘内筋の多様さや数の多さは、それを支配する $\gamma$ 運動ニューロンの占有率の高さを反映する可能性もある。

咬筋の随意的等尺性運動において、中枢パターン生成器により $\alpha$ 運動ニューロンと $\gamma$ 運動ニューロンが同時に活動することで咬合力の調節がなされているが、本研究より得られた $\gamma$ 運動ニューロンの占有率の高さは、この噛み締め運動の微

細な調節機構において、筋紡錘反射経路が重要な役割りを果たすことを強く示唆している。

## 成長に伴う Err3 の発現パターンの変化および雌雄間におけるその発現パターンの差異

すでに述べたように、ラットの吸啜から咀嚼への移行は生後 12 日前後に行われるため、本研究で用いたラットは生後 8 週齢であり、吸啜から咀嚼への移行は完了していると考えられる。Friese ら<sup>14)</sup>は、生直後のマウスでは、腰髄のニューロンの細胞体の大小に関わらず広範囲にわたって Err3 が発現しているが、生後 2 週齢までに Err3 の発現が  $\gamma$  運動ニューロンに徐々に限局化していくことを報告している。吸啜運動における  $\gamma$  運動ニューロンの関与の有無は不明であり、吸啜と咀嚼では、 $\gamma$  運動ニューロンの関わり方が異なる可能性もある。吸啜から咀嚼へ移行する過程で、三叉神経運動核における Err3 の発現パターンがどのように変わるかを調べることにより、 $\gamma$  運動ニューロンの咀嚼運動への関与がさらに明らかになることは興味深い。

また、本研究では、すべて雄性のラットを対象に実験を行った。 $\gamma$  運動ニューロンのマーカーとなる Err3 は核内の estrogen receptor の一つである。雌雄間で Err3 の発現量、あるいはこれに結合するリガンドの量が異なると考えた場合、Err3 の運動ニューロン分化に関わる機能が雌雄間で異なる可能性が考えられる。このため、Err3 の発現が雌雄で差があるのか、また、これに対して、NeuN の発現の有無に影響するのかを検証が必要であると言える。



## 今後の展望

本研究では、免疫組織学的に $\alpha$ および $\gamma$ 運動ニューロンを識別し、ラット三叉神経運動核閉口筋支配領域では、 $\alpha$ 運動ニューロンのサイズは小型の細胞も含め幅広い分布を示すこと、および $\gamma$ 運動ニューロンの占有率が高いことが明らかとなり、閉口筋の随意的等尺性運動における調節機構に関係する分子基盤の一部が解明された。今後は、 $\alpha$ および $\gamma$ 運動ニューロンを組織学的側面のみならず機能的側面も合わせて識別し、それぞれの運動ニューロンの神経生理学的特性を明らかにすることが、噛み締め運動の制御における脳神経メカニズムを解明する上で重要であると考えられる。

## 結論

これまで運動神経核中の小型細胞群は $\gamma$ 運動ニューロンであると想定されてきたが、閉口筋運動ニューロン群における小型細胞群は、他の骨格筋と異なり、 $\alpha$ 運動ニューロンによっても構成されている。このことは、サイズの原理<sup>6)</sup>から、閉口筋 $\alpha$ 運動ニューロン群が支配する筋線維は、収縮速度が速い type II fiber ではある<sup>16), 17)</sup>が、筋線維径の極めて小さい赤筋線維と筋線維径の大きい白筋線維を含むという先行研究<sup>19)</sup>と整合性がとれる。一方、運動ニューロン群中の $\gamma$ 運動ニューロンの占める割合は、脊髓前角と比較して閉口筋領域で高かった。これらことから、閉口筋の緻密な筋張力の調節機構が存在することが示唆された。

## 謝辞

稿を終えるにあたり，本研究を行う機会を与えていただき，終始御鞭撻を賜りました大阪大学大学院歯学研究科顎顔面口腔矯正顎教室 高田健治教授，同研究科口腔生理学教室 姜英男教授，および多大なる御協力と御助言を賜りました京都大学大学院医学研究科高次脳形態学教室 金子武嗣教授に深甚なる謝意を表します。また，実験手技のご指導を賜りました同教室 倉本恵梨子助教に心より謝意を表します。

最後に本研究の円滑な進展のため，特別な御配慮，御協力をいただきました大阪大学大学院歯学研究科顎顔面口腔矯正学教室，同研究科口腔生理学教室，ならびに京都大学大学院医学研究科高次脳形態学教室の教室員各位に厚く御礼申し上げます。

## 文献

- 1) Fluton, J.F. (1931): The functional activity of single units in the central nervous system.  
*Science*. **73**, 685-692.
  
- 2) Crenna, P. and Frigo, C. (1987): Excitability of the soleus H-reflex arc during walking and stepping in man. *Exp. Brain Res.* **66**, 49-60.
  
- 3) Yemm, R. (1977): The orderly recruitment of motor units of the masseter and temporal muscles during voluntary isometric contraction in man. *J. Physiol.* **265**, 163-174.
  
- 4) Vallbo, A.B. (1970): Slowly adapting muscle receptors in man. *Acta Physiol. Scand.* **78**, 315-333.
  
- 5) Graint, R. (1975): The functional role of the muscle spindles—facts and hypotheses.  
*Brain* **98**, 531-956.

- 6) Henneman, E. (1991): The size principle and its relation to transmission failure in Ia projections to spinal motoneurons. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **627**, 165-168.
- 7) Lund, J.P. (1991): Mastication and its control by the brain stem. *Crit. Rev. Oral. Biol. Med.* **2**, 33-64.
- 8) Miles, T.S., Polakov, A. V. and Nordstorm, M. A. (1995): Responses of human masseter motor units to stretch. *J. Physiol.* **483**, 251-264.
- 9) Lennartsson, B. (1979). Muscle spindles in the human anterior digastric muscle. *Acta Odontol Scand.* **37**, 329-333.
- 10) Kubota, K., Masegi, T. (1977): Muscle spindle supply to the human jaw muscle. *J Dent Res.* **56**, 901-909.
- 11) Pang, Y-W., Ge, S-N., Nakamura, K. Li, J-L., Xiong. K-H., Kaneko, T. and Mizuno, N. (2009): Axon Terminals Expressing Vesicular Glutamate Transporter VGLUT1 or

VGLUT2 Within the Trigeminal Motor Nucleus of the Rat: Origins and Distribution

Patterns. *J. Comp. Neurol.* **512**, 595–612.

- 12) Rokx, J.T.M. Willigen, J.D. and Juch, P.J.W. (1985): Distribution of Innervating Neurons of Masticatory Muscle Spindles in the Rat: An HRP Study. *Exp Neurol.* **88**, 562-569 .
- 13) Vincent, G. (2002): To ERR in the estrogen pathway. *Trends Endocrinol Metab.* **13**, 220-225.
- 14) Friese, A., Kaltschmidt, J.A., Ladle, D.R., Sigrist, M., Jessell, T.M. and Arber S. (2009): Gamma and alpha motor neurons distinguished by expression of transcription factor Err3. *PNAS.* **32**, 13588–13593.
- 15) Mullen, R.J., Buck, C.R. and Smith, A.M. (1992): NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development.* **116**, 201–211.

- 16) Tuxen, A. and Kirkeby, S. (1990): An Animal Model for Human Masseter Muscle: Histochemical Characterization of Mouse, Rat, Rabbit, Cat, Dog, Pig, and Cow Masseter Muscle. *J Oral Maxillofac Surg.* **48**, 1063-1067.
- 17) Suzuki, A. (1977): A Comparative Histochemical Study of the Masseter Muscle of the Cattle, Sheep, Swine, Dog, Guinea Pig, and Rat. *Histochemistry.* **51**, 121-131.
- 18) Tsukamoto, S. and Mori, M. (1966): Distribution of Muscle Fibers of Three Types Differentiated by Succinic Dehydrogenase Activity in the Skeletal Muscle. *Arch. histol. jap.* **26**, 329-339.
- 19) 恩田 聰.(1984): ラット咬筋の筋線維構成について. *昭和医学会雑誌.* **44**, 523-529.
- 20) Mizuno, N., Konishi, A. and Sato, M. (1975): Localization of masticatory motoneurons in the cat and rat by means of retrograde axonal transport of horseradish peroxidase. *J. Comp. Neurol.* **164**, 105-115.



- 21) Limwongse, V. and DeSantis, M. (1977): Cell body locations and axonal pathways of neurons innervating muscles of mastication in the rat. *Am. J. Anat.* **149**, 477-488.
- 22) Thexton, A.J. and Griffith, C. (1979): Reflex oral activity in decerebrate rats of different age. *Brain. Res.* **175**, 1-9.
- 23) Westnieat, M.W. and Hall, W.G. (1992): Ontogeny of feeding motor patterns in infant rats: an electromyographic analysis of suckling and chewing. *Behav. Neurosci.* **106**, 539-554.
- 24) Tourtellotte, W.G., Milbrandt, J. (1998): Sensory ataxia and muscle spindle agenesis in mice lacking the transcription factor Egr3. *Nature Genet.* **20**, 87-91.
- 25) Arber, S., Ladle, D.R., Lin, J.H., Frank, E., Jessell, T.M. (2000): ETS gene Er81 controls the formation of functional connections between group Ia sensory afferents and motor neurons. *Cell.* **101**, 485-498.

- 26) Hippenmeyer S, et al. (2002): A role for neuregulin1 signaling in muscle spindle differentiation. *Neuron*. **36**, 1035–1049.
- 27) Osterlund, C., Liu, G.X., Thornell, L.E. and Eriksson P.O. (2011): Muscle Spindle Composition and Distribution in Human Young Masseter and Biceps Brachii Muscles Reveal Early Growth and Maturation. *Anat. Rec.* **294**, 683-693.
- 28) Eriksson, P.O., Bulter-Browne, G.S. and Thornell, L.E. (1994): Immunohistochemical Characterization of Human Masseter Muscle Spindles. *Muscle Nerve*. **17**, 31-41.
- 29) Boyd, I. A. (1981): The action of three types of intrafusal fibre in isolated cat muscle spindles on the dynamic and length sensitivities of primary and secondary sensory endings. *Muscle Receptors and Movement*, 17-32.
- 30) Eriksson, P.O. and Thornell, L.E. (1990): Variation in Histochemical Enzyme Profile and Diameter Along Human Masseter Intrafusal Muscle Fibers. *Anat. Rec.* **226**, 168-176.

31) Liu, J-X., Eriksson, P-O., Thornell, L-E, Pedrosa-Domellof, F. (2002): Myosin heavy chain composition of muscle spindles in human biceps brachii. *J Histochem Cytochem.* **50**, 171–183.

32) Brown, M.C., Matthews, P.B.C. (1966): On the subdivision of the efferent fibres to muscle spindles into stati and dynamic fusimotor fibres. *Control and Innervation of Skeletal Muscle, Thomson, Dundee.* 18–34.

## 図の説明

### 図 1 蛍光染色に用いた蛍光色素の波長特性，励起波長およびフィルター領域

蛍光染色を行った切片を共焦点レーザー顕微鏡 LSM510 で観察した際の，蛍光色素の波長特性，励起波長，およびフィルター領域を示す．Alexa Fluor 649, Cy3 および Alexa Fluor 488 をそれぞれ 633 nm, 543 nm, 488 nm のレーザー光により励起し，660–788 nm, 560–615 nm, 505–530 nm のバンドパスフィルターを用いて蛍光を検出した．

### 図 2 ラット三叉神経運動核における VGLUT1 の発現分布

図 A が ChAT/Err3/VGLUT1 の蛍光三重染色，図 B がその VGLUT1 のシグナル，図 C が ChAT/Err3 の明視野二重染色の結果である．蛍光三重染色を行った切片では，三叉神経運動核において背外側領域（赤色の破線で囲まれた領域）では VGLUT1 の発現が強く，これに対して腹内側領域（黄色の破線で囲まれた領域）は VGLUT1 の発現がほとんど認められない（図 A および B）．L；外側，D；背側

#### 図 3,4 ラット三叉神経運動核における Err3 の発現分布

ChAT/Err3/VGLUT1 の蛍光三重染色の結果である。左上のパネルが VGLUT1 のシグナル、右上のパネルが Err3 のシグナル、左下のパネルが ChAT のシグナル、右下のパネルが重ね合わせ像を示す。図 3A と 3B および 4A と 4B は、それぞれ同じ視野の Z 軸を前者は 2 $\mu$ m、後者は 1 $\mu$ m だけ変えた断面の撮影像であり、細胞の核小体が観察される断面である。Filled arrow head は Err3 陽性の  $\gamma$  運動ニューロンを、open arrow head は Err3 陰性の  $\alpha$  運動ニューロンを示す。

#### 図 5,6 ラット三叉神経運動核における NeuN の発現分布

ChAT/NeuN/VGLUT1 の蛍光三重染色の結果である。左上のパネルが VGLUT1 のシグナル、右上のパネルが NeuN のシグナル、左下のパネルが ChAT のシグナル、右下のパネルが重ね合わせ像を示す。図 6A および 6B は、同じ視野の Z 軸を 1 $\mu$ m だけ変えた断面の撮影像であり、細胞の核小体が観察される断面である。Filled arrow head は NeuN 陰性の  $\gamma$  運動ニューロンを、open arrow head は NeuN 陽性の  $\alpha$  運動ニューロンを示す。

## 図 7 ラット三叉神経運動核における Err3 および NeuN の発現分布

図 A および B は ChAT/Err3 の明視野二重染色の結果を示す。図 A の arrow は ChAT 陽性/Err3 陽性の  $\gamma$  運動ニューロンを、図 B の arrow head は ChAT 陽性/Err3 陰性の  $\alpha$  運動ニューロンを示す。図 C および D は ChAT/NeuN の明視野二重染色の結果を示す。図 C の arrow は ChAT 陽性/NeuN 陰性の  $\gamma$  運動ニューロンを、図 D の arrow head が ChAT 陽性/NeuN 陽性の  $\alpha$  運動ニューロンを示す。

## 図 8 ラット三叉神経運動核の閉口筋および開口筋支配運動ニューロン群の細胞体断面積の分布

A および B のグラフは ChAT/Err3 染色を、C および D のグラフは ChAT/NeuN 染色を行った場合のラット三叉神経運動核 閉口筋および開口筋支配運動ニューロンの断面積の分布パターンを示す。

## 図 9 ラット三叉神経運動核 閉口筋支配領域における $\alpha$ および $\gamma$ 運動ニューロンの細胞体断面積の分布

A および B のグラフは ChAT/Err3 染色を、C および D のグラフは ChAT/NeuN 染色を行った場合のラット三叉神経運動核 閉口筋支配領域の  $\alpha$  および  $\gamma$  運動ニュー



ロンの断面積の分布を示す。いずれのグラフも、グレーのヒストグラムは閉口筋領域における ChAT 陽性全運動ニューロンの分布を示し、そのうち赤で示されたグループは、A のグラフでは ChAT 陽性/Err3 陰性、B のグラフでは ChAT 陽性/Err3 陽性の運動ニューロン群の分布を、青で示されたグループは、C のグラフでは ChAT 陽性/NeuN 陽性、D のグラフでは ChAT 陽性/NeuN 陰性の運動ニューロンの分布を示す。閉口筋支配運動ニューロン群のうち、 $\gamma$  運動ニューロンと同定されたニューロンの割合は、ChAT/Err3 の染色では 34.7%、ChAT/NeuN の染色では 35.8%である (B および D)。

#### 図 10 ラット三叉神経運動核の閉口筋および開口筋支配運動ニューロン群の細胞体径の分布

A および B のグラフは ChAT/Err3 染色を、C および D のグラフは ChAT/NeuN 染色を行った場合のラット三叉神経運動核 閉口筋および開口筋支配運動ニューロンの細胞体径の分布を示す。

図 11 ラット三叉神経運動核 閉口筋支配領域における  $\alpha$  および  $\gamma$  運動ニューロンの細胞体径の分布

A および B のグラフは ChAT/Err3 染色を，C および D のグラフは ChAT/NeuN 染色を行った場合のラット三叉神経運動核 閉口筋支配領域の  $\alpha$  および  $\gamma$  運動ニューロンの細胞体径の分布を示す．いずれのグラフも，グレーのヒストグラムは閉口筋領域における ChAT 陽性全運動ニューロンの分布を示し，そのうち赤で示されたグループは，A のグラフでは ChAT 陽性/Err3 陰性，B のグラフでは ChAT 陽性/Err3 陽性の運動ニューロン群の分布を，青で示されたグループは，C のグラフでは ChAT 陽性/NeuN 陽性，D のグラフでは ChAT 陽性/NeuN 陰性の運動ニューロンの分布を示す．

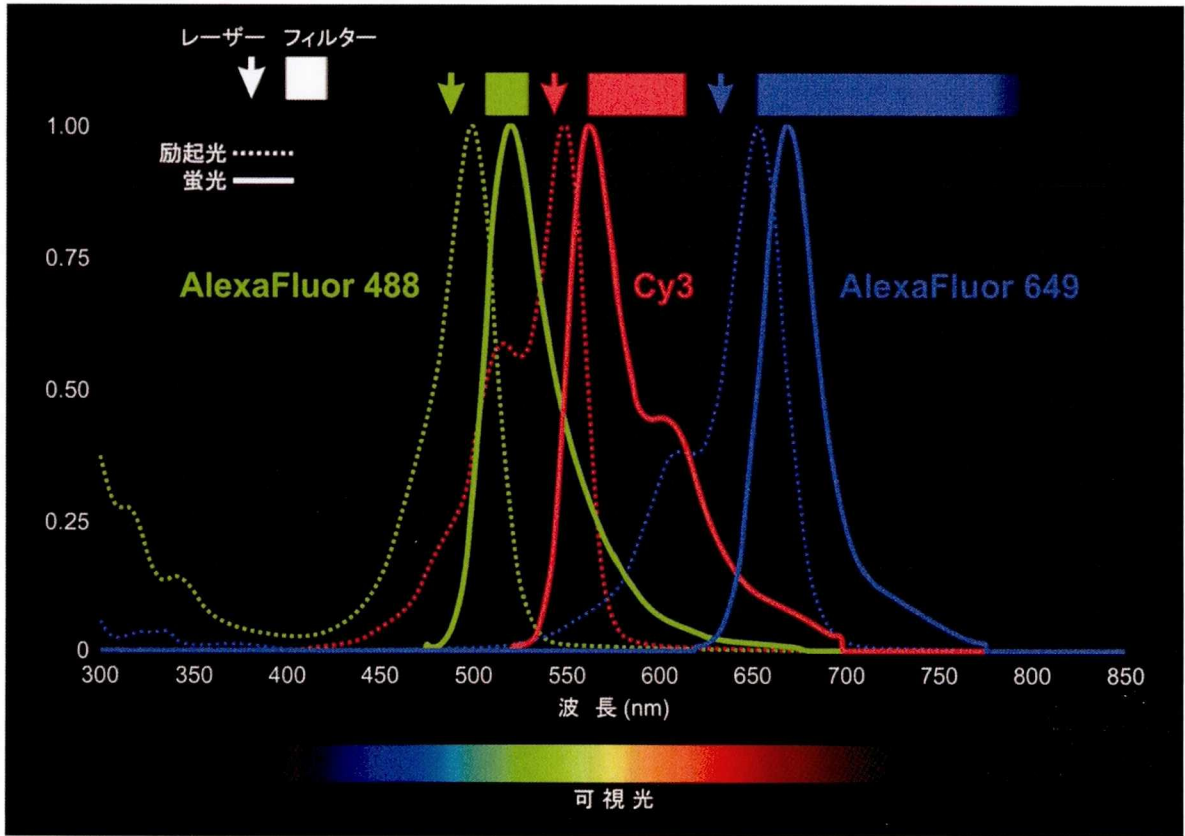


図 1

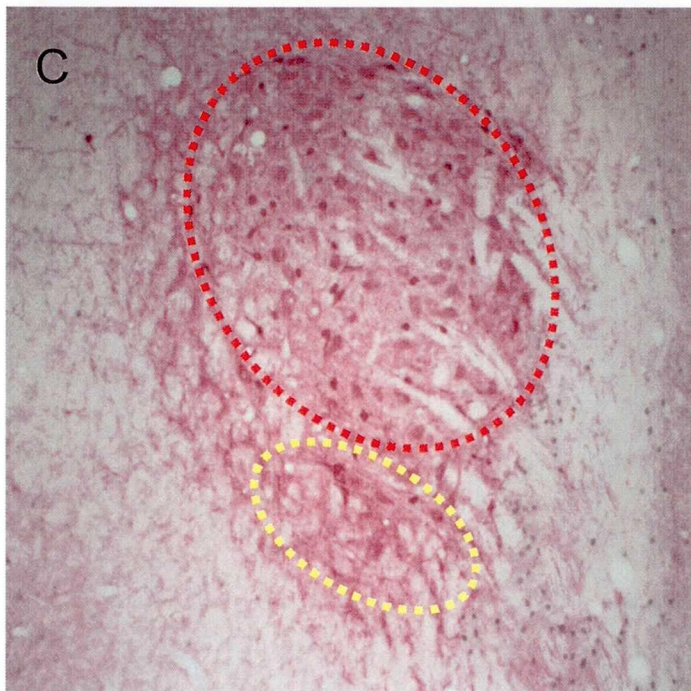
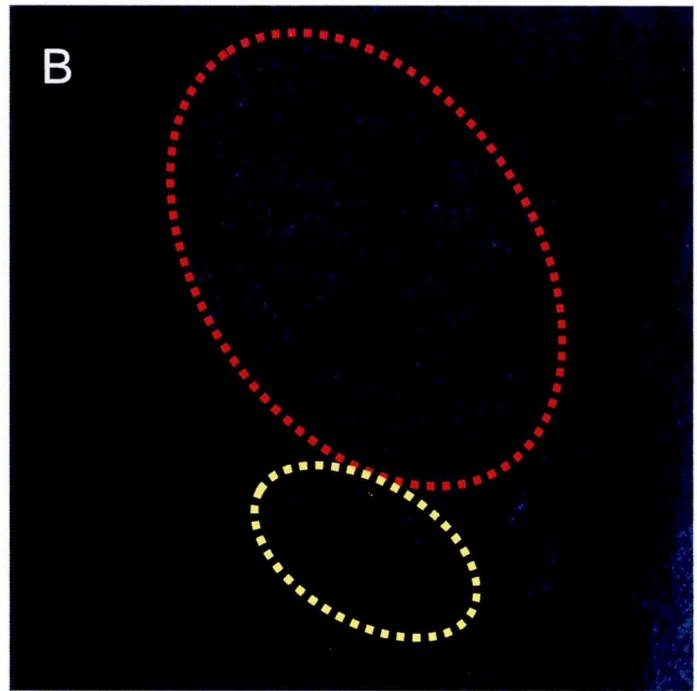
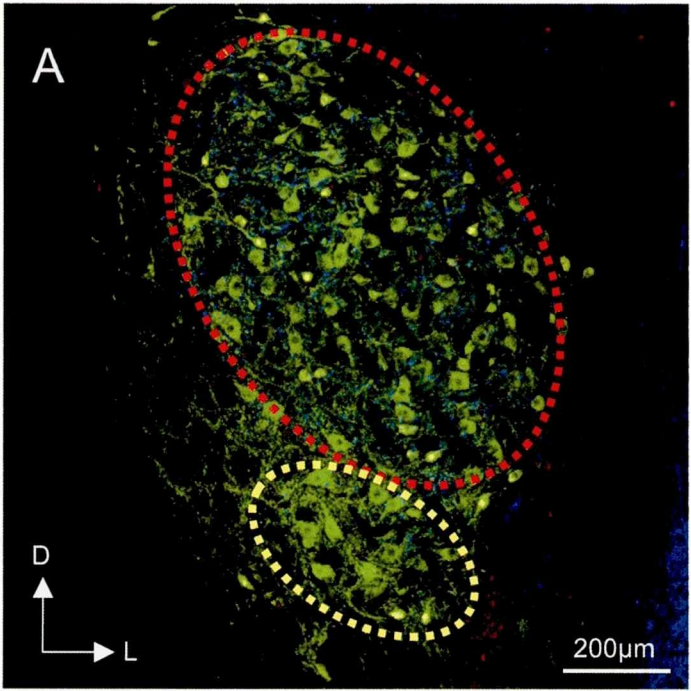
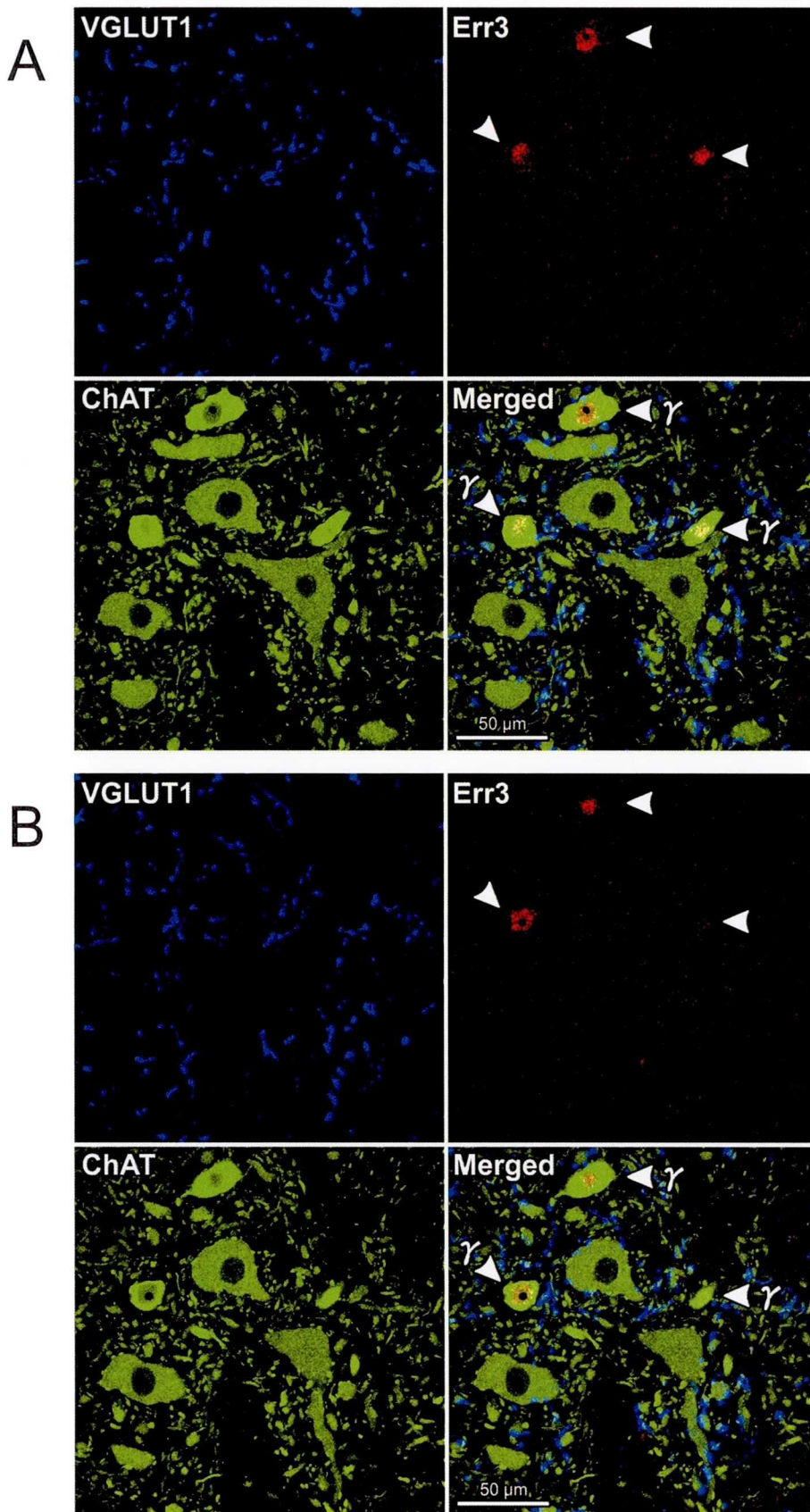
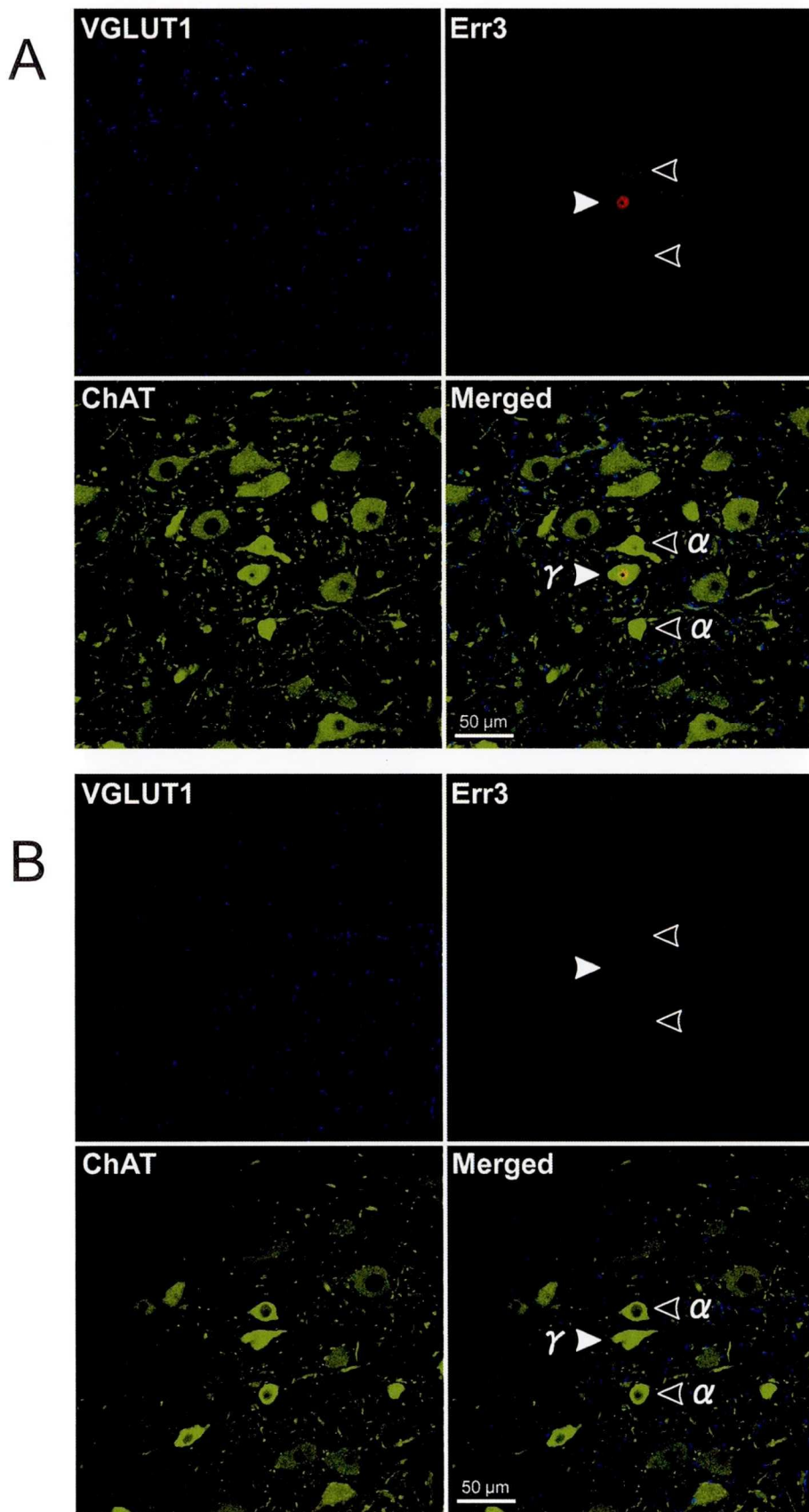


图 2



☒ 3





☒ 4

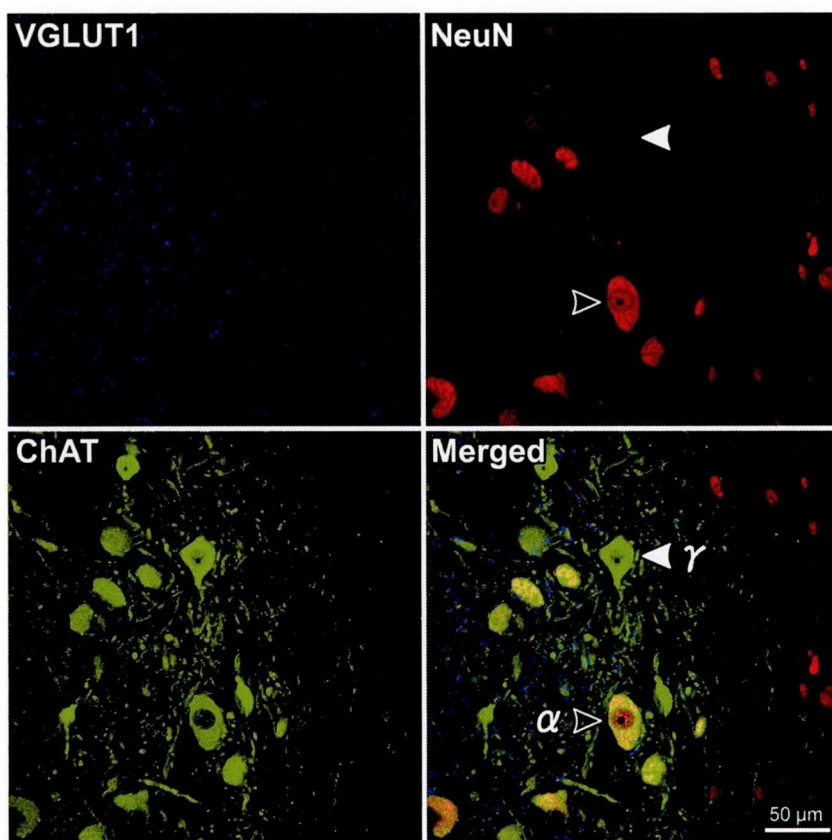


图 5

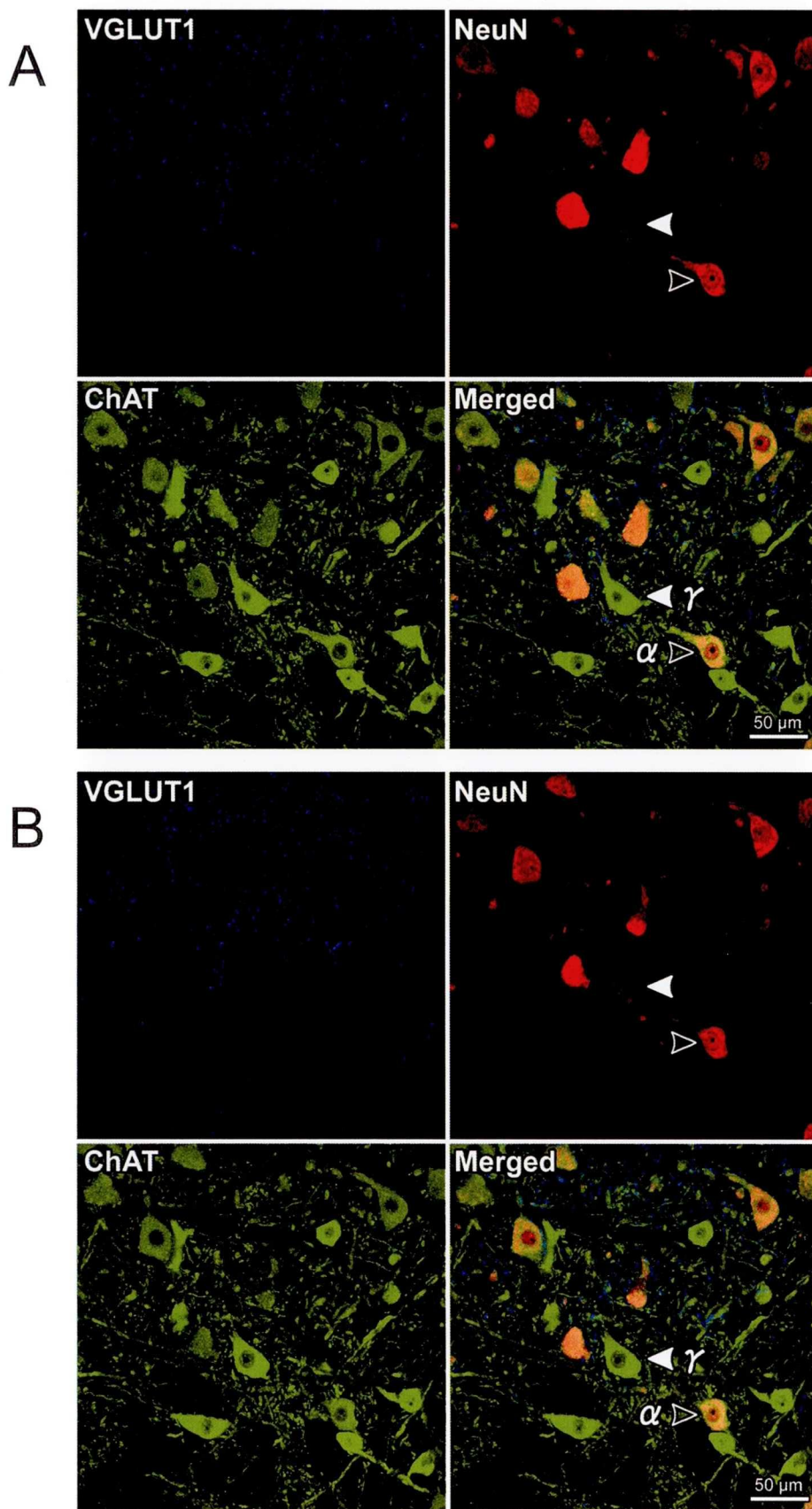


图 6



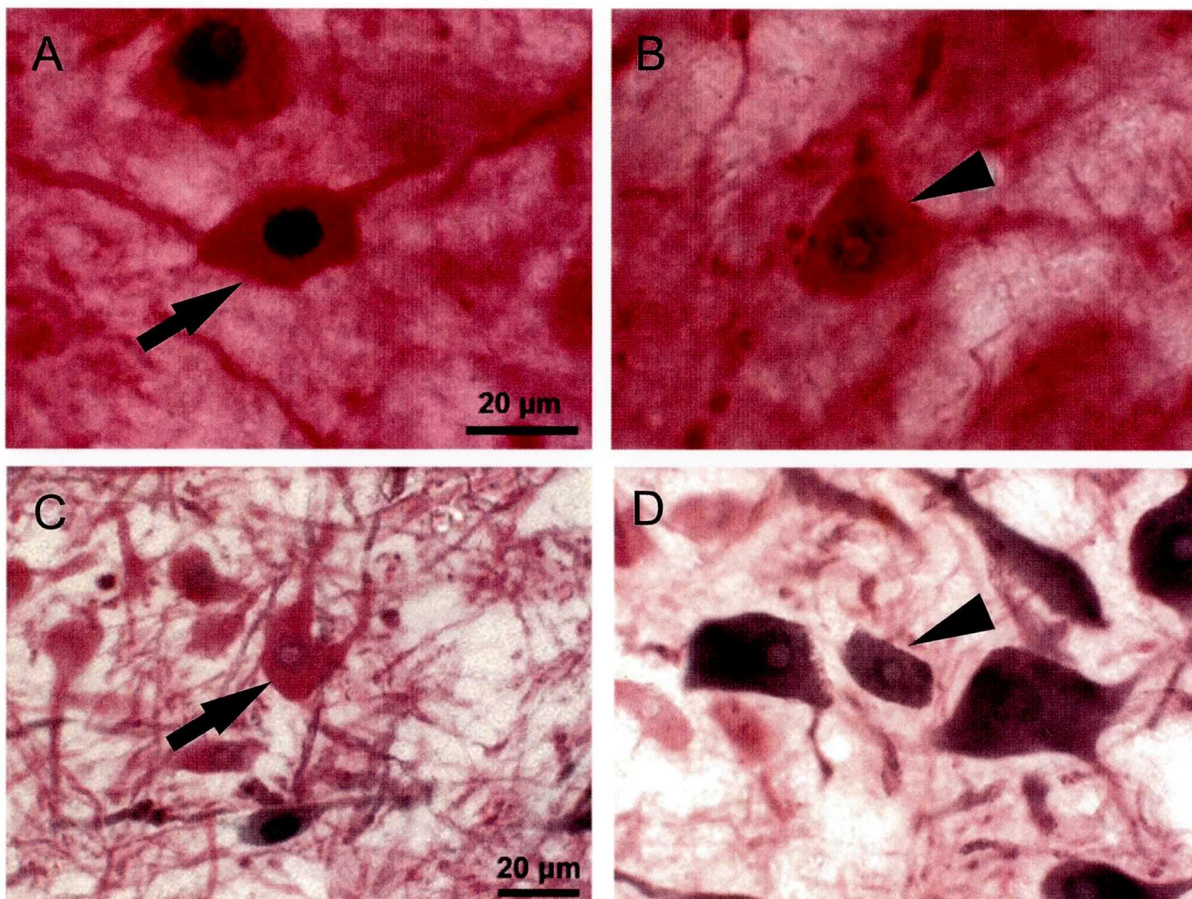


图 7

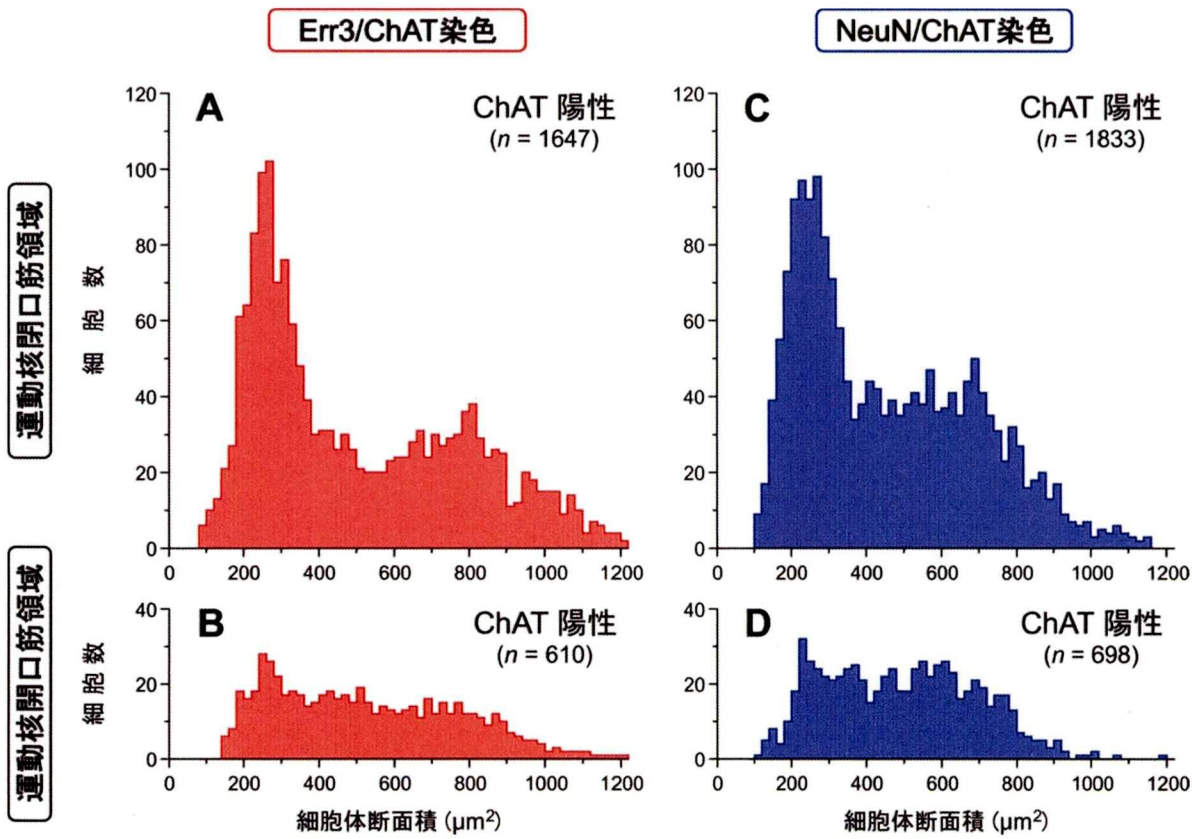


図 8

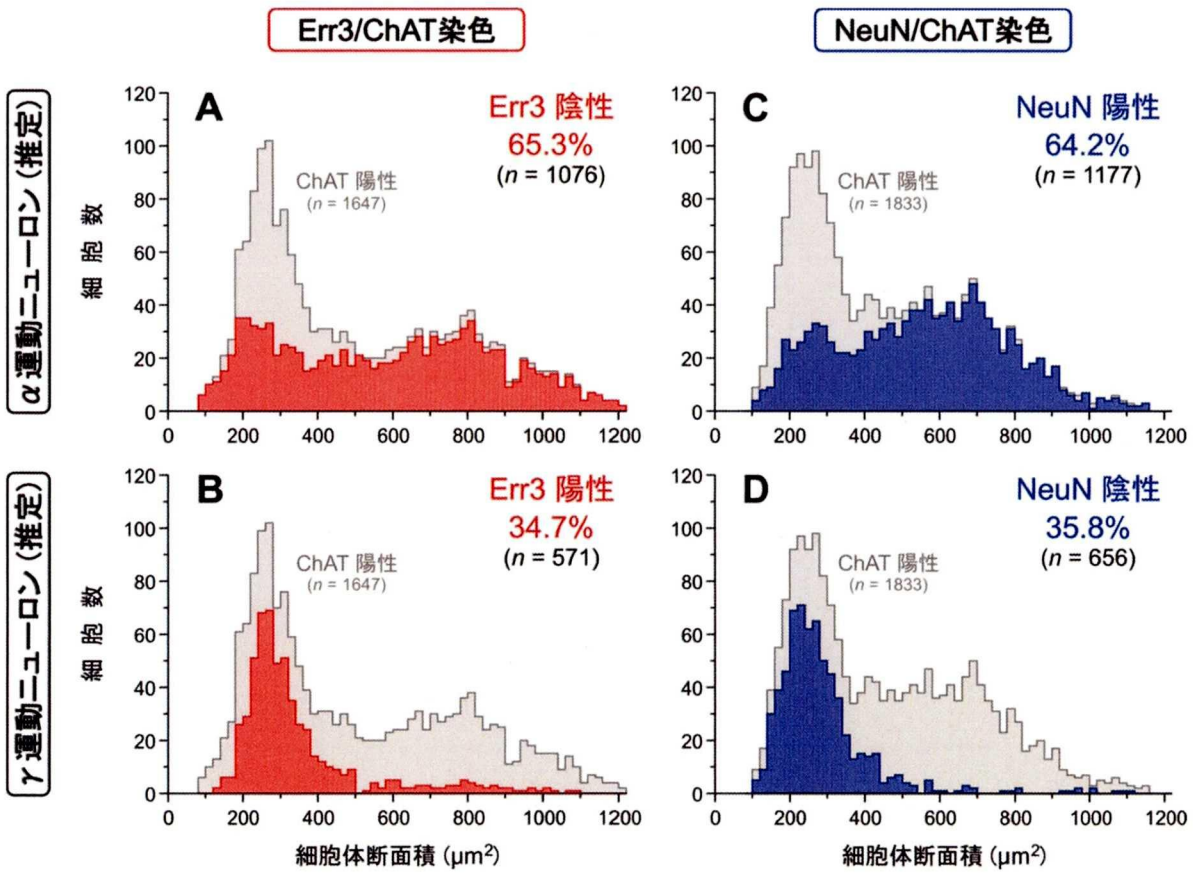


図 9

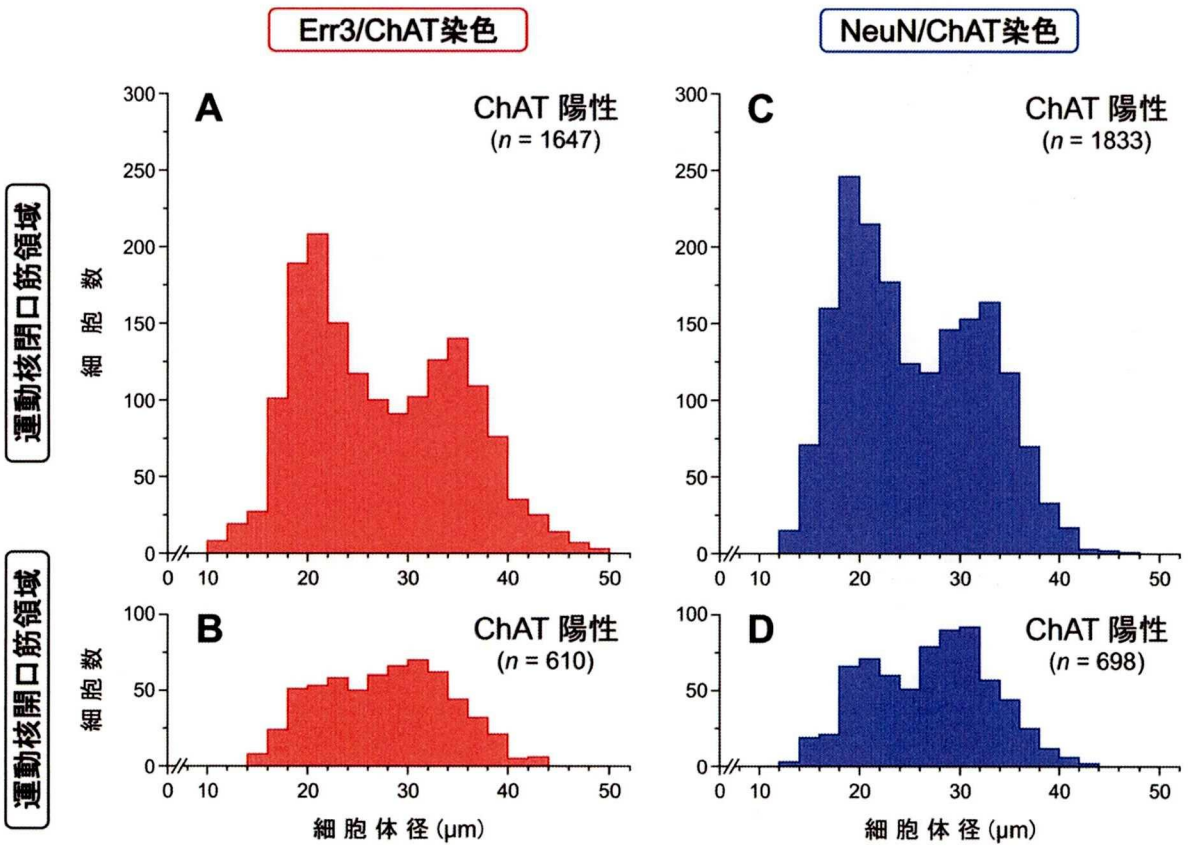


図 10



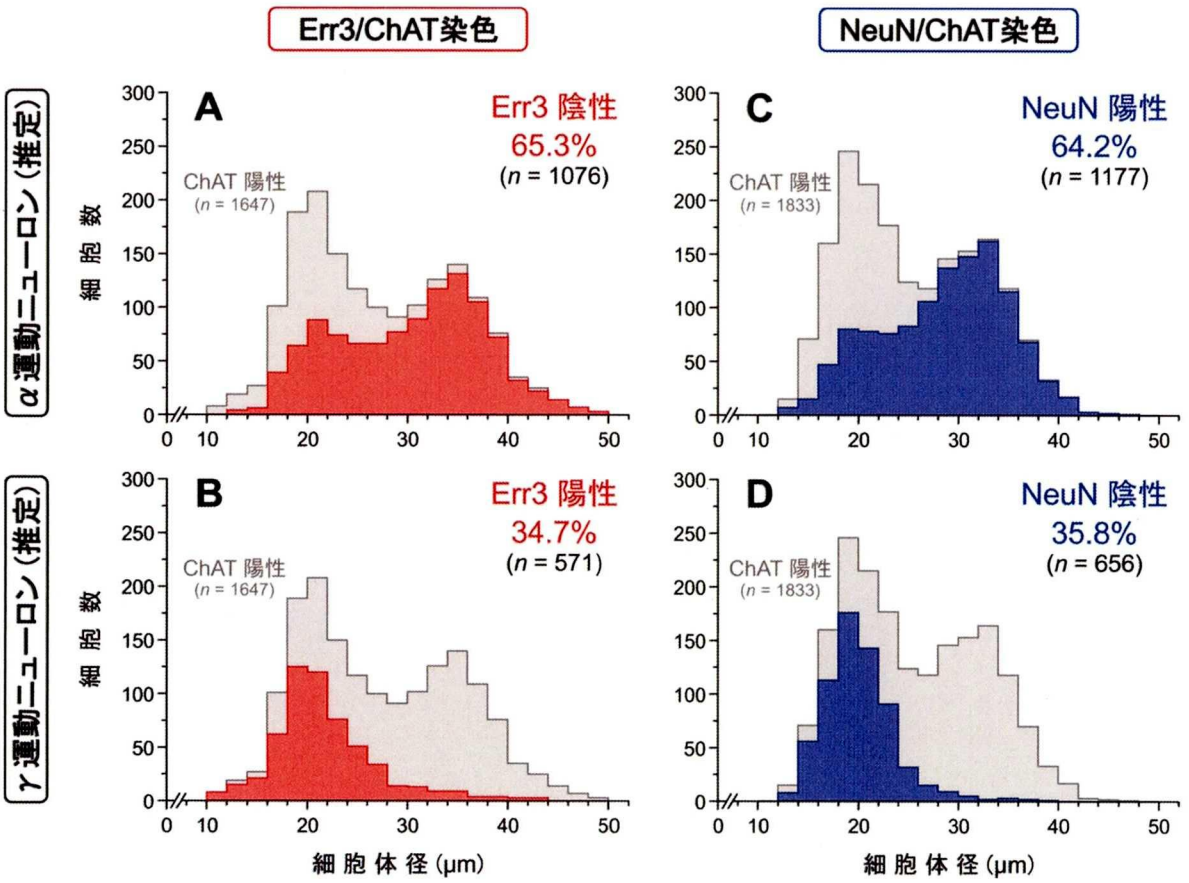


図 11



