



Title	パーキンソン病の顎口腔運動異常の発症メカニズムの解明
Author(s)	堤, 友美
Citation	平成28年度学部学生による自主研究奨励事業研究成果報告書. 2017
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/60352
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

平成28年度学部学生による自主研究奨励事業研究成果報告書

ふりがな 氏名	つつみ ゆみ 堤 友美	学部 学科	歯学部 歯学科	学年	4年
ふりがな 共同 研究者名		学部 学科		学年	年
					年
					年
					年
アドバイザー教員 氏名	吉田 篤	所属	歯学研究科		
研究課題名	パーキンソン病の顎口腔運動異常の発症メカニズムの解明				
研究成果の概要	研究目的、研究計画、研究方法、研究経過、研究成果等について記述すること。必要に応じて用紙を追加してもよい。				

研究の背景と目的

パーキンソン病で認められる運動疾患の治療法として、脳内で運動制御に関わることが知られている大脑基底核の破壊（焼灼）法や、最近では脳深部電気刺激療法（DBS）が盛んに用いられている。しかし、パーキンソン病で発症する体幹四肢の振戦に対する破壊またはDBS治療は、大脑基底核よりも、体幹四肢の筋感覚が入力する視床腹中間核（Vim：この核はラットを含むサル以下の動物において、体幹四肢の感覚の一大中継基地である視床後外側腹側核[VPL]の吻側部[VPLo]に相当する）が対象となっている。この事実は、パーキンソン病で認められる口腔顔面領域の振戦の治療として、口腔顔面領域の感覚が入力する視床後内側腹側核(VPM)が対象となり得ることを強く示唆している。しかしながら、パーキンソン病の口腔顔面領域の振戦に、視床の破壊およびDBS治療は未だ行われていない。それは、ヒトばかりでなく全ての動物において、口腔顔面領域の筋感覚が入力する視床部位が同定出来ていないことと、視床の破壊およびDBS治療がどのような神経機構で振戦治療に効果が出るのかが未だに不明なことが影響していると考えられる。

そこで、本申請研究を実施した歯学研究科口腔解剖学第二教室では、ラットを用い、咀嚼筋筋紡錘感覚が伝達する三叉神経上核（V^{sup}）を同定し（Fujio et al., 2016）、咀嚼筋筋紡錘感覚がこのV^{sup}を経由してVPMの尾腹内側部（VPMcvm）に投射する事を明らかにした（Yoshida et al., in press）。これらの結果は、VPMcvmがパーキンソン病で認められる口腔顔面領域の振戦の治療の対象部位と成り得ることを示している。このような背景のもと、本研究では、VPMcvmの破壊およびDBS治療がどのような脳内神経回路に影響を与えることで治療効果が出現するのかの解明をめざした。つまり、上記の先行研究で明らかになったVPMcvmに伝達された咀嚼筋筋紡錘感覚が、大脑皮質のどの部位に投射し影響を与えているのかの解明を本研究の目的とした。

実験方法

実験には 250 - 300 g の雄性 Wister 系ラットを用いた。実験は、大阪大学大学院歯学研究科の動物倫理規約に従って行った（私も研究者として登録した）。ペントバルビタール（55 mg/kg）を腹腔内に注射して全身麻酔を行った。体温は 36°C から 38°C になるようヒートパッドで調節し、心電図をモニターしながら、生理学的条件下で行った。

神経トレーサーの脳内注入と脳部位の細胞構築学的同定は、Paxinos and Watson のラットの脳図譜第 4 版（1998）を参照した。実験は次の 2 部に分けて行った。

実験 1：閉口筋筋紡錘感覺が入力する視床部位（VPMcvm）から大脳皮質への投射部位および投射様態の解明のための実験

右側の咬筋神経を剖出後、電気刺激用のフック電極を取り付けた。動物を脳定位固定装置に固定した。先行研究（Yoshida et al., in press）で明らかになった左側の VPMcvm の上方の頭頂骨を歯科用ドリルにて削去して脳硬膜を露出させたのち、それを開窓して大脳皮質の表面を露出した。0.2 M potassium citrate を充填した記録用ガラス管微小電極を、露出した皮質表面から視床に挿入した。咬筋神経の電気刺激（単発刺激、0.2 ms duration, 1 Hz）と下顎の下制に対する応答を記録し、VPMcvm を同定した。次に双方行性神経トレーサーである wheat-germ agglutinin conjugated horseradish peroxidase (WGA-HRP) の 3% 溶液を電気泳動（+電流、2.0 μA、300 ms、2Hz、7-12 分間）にて微量注入した。

注入の 2-3 日後に動物をペントバルビタール（100 mg/kg）の腹腔内注射で深麻酔後、4% パラホルムアルデヒド溶液にて灌流固定し、脳を摘出した。次にミクロトームで凍結連続切片（厚さ 60 μm）を作成し 3 セットに分けた。その 1 セットは tetramethyl benzidine (TMB) 反応を施し、残りの 2 セットは diaminobenzidine (DAB) 反応を施し WGA-HRP で標識されたニューロンを可視化した。その 2 セットのうちの 1 セットは Neutral red で対比染色を行い、他は対比染色しなかった。標識された神経軸索終末と神経細胞体の脳内分布を光学顕微鏡にて観察した。camera lucida で標識神経軸索終末と標識神経細胞体をトレースし、また顕微鏡写真を撮影した。

実験 2：実験 1 で明らかになった視床 VPMcvm- 大脳皮質路が Vsup-VPMcvm 路を通る筋紡錘感覺入力をうけることの解明のための実験

実験 1 と同様に、咬筋神経にフック電極を取り付けた後、動物を脳定位固定装置に固定した。実験 1 で解明された VPMcvm からの強い投射がある大脳皮質部位に、逆行性神経トレーサーである fluorogord (FG) の 1% 溶液を封入したガラス管微小電極を刺入し、電気泳動（+電流、2.0 μA、300ms、2Hz、10-15 分間）にて FG を微量注入した。また同じ動物で、先行研究（Fujio et al., 2016; Yoshida et al., in press）を参考にして Vsup に、順行性神経トレーサーである biotinylated dextranamine (BDA) の 4% 溶液を封入したガラス管微小電極を刺入し、電気泳動（+電流、2.0 μA、300ms、2Hz、7-10 分間）にて BDA を微量注入した。その一週間後に、実験 1 と同様に動物を灌流固定し、脳を摘出し、切片を作成した。FG 標識細胞の可視化には、FG 抗体と DAB 反応を用いた。BDA 標識された神経軸索終末の可視化には、DAB 反応を用いた。実験 1 と同様に光学顕微鏡にて観察し、顕微鏡写真を撮影した。

結果

実験 1 では、先行研究 (Yoshida et al., in press) に従い、左側視床の VPMcvm を狙って WGA-HRP を封入したガラス管微小電極を刺入し、咬筋刺激の電気刺激によって潜伏時間がおよそ 2.8 msec の陰性波が記録され、かつ下顎の下制でバーストスパイクが記録された部位に WGA-HRP を微量注入した。切片作成後の観察で、注入部位が VPMcvm をカバーしていたケースのうち、逆行性に標識されたニューロンの細胞体が Vsup には認められるが、三叉神経主感覺核や結合腕傍核には認められなかつたケースにおいて、順行性に標識された軸索終末の左側の大脳皮質内の分布を観察した。その結果、標識軸索終末が、bregma から吻側～0.9 mm の顆粒性島皮質 (GI) の第 IV 層を中心として密に認められたが、特に、その背側に接した二次体性感覚野の腹側部の第 IV 層にも少数認められた。

実験 2 では、実験 1 で明らかになった bregma から吻側～0.9 mm の、右側の顆粒性島皮質 (GI) の第 IV 層を狙って FG を封入したガラス管微小電極を刺入し、FG を微量注入した。同一動物で、先行研究 (Fujio et al., 2016) に従い、左側 Vsup を狙って BDA を封入したガラス管微小電極を刺入し、咬筋刺激の電気刺激によって潜伏時間がおよそ 1 msec の陰性波が記録され、かつ下顎の下制でバーストスパイクが記録された部位に FG を微量注入した。切片作成後の観察で、FG 注入部位がターゲットの顆粒性島皮質 (GI) 第 IV 層をカバーし、かつ、BDA 注入部位が Vsup をカバーしているケースにおいて、右側の視床内に認められる逆行性に FG 標識された細胞体と順行性に BDA 標識された軸索終末の分布を観察した。その結果、FG 標識された細胞体と BDA 標識された軸索終末が VMPcm およびそれに近接した周囲に認められた。前者よりも後者の方が、出現範囲が狭く VPMcvm により限局していた。FG 標識された細胞体（ならびに樹状突起基部）にコンタクトしている BDA 標識された軸索終末が少数認められた。

結論

- 1) 咀嚼筋筋感覚が入力する VPMcvm は主に同側の GI に投射する事が明らかになった。
- 2) 咀嚼筋筋感覚の GI への入力は (三叉神経中脳路核ニューロン) - Vsup ニューロン-VPMcvm ニューロンを経由して行われていることが強く示唆された。

考察

体性感覚である筋紡錘からの自己受容感覚が、驚いたことに、VPMcvm を経由して、弁別機能などに関与する大脳皮質の体性感覚野よりも、情動や自律機能に関与する島皮質の GI に伝達される事が明らかになった。島皮質 GI は、咀嚼筋筋紡錘感覚を伝達する一次求心ニューロンである三叉神経中脳路核ニューロンの細胞体に直接投射することがわかっている (Iida et al., 2010) ので、本研究で明らかになった GI への経路は、咀嚼筋筋紡錘感覚の上行伝達のフィードバックコントロールに影響を与えていていることが考えられる。この GI に至る経路の中継核である VPMcvm の破壊および DBS 治療がパーキンソン病の口腔顔面領域の振戦に奏効するならば、その奏効に、本研究で明らかになった情動や自律機能への影響の変化や咀嚼筋筋紡錘感覚の伝達のフィードバックコントロールの変化が関与していると推察される。

今後の予定

本研究では、VPMcvm から同側の GI に投射することが形態学的には明らかになったが、筋紡錘感

覚の伝達が実際にこの経路によって行われていることは GI での末梢性入力の記録を行っていないため明らかになっていない。したがって、今後の予定として、VPMcvm ニューロンが投射する GI 部位のより厳密な同定と、その GI が咀嚼筋筋紡錘感覺を実際に受けていることを電気生理学的手法を用いて明らかにする必要があると考えている。この経路の発見は、体性感覚であると考えられてきた筋紡錘感覺の位置づけを再確認する機会となり得る。また、筋紡錘感覺が情動や自律機能と深く関係するならば、未だ詳しく明らかになっていない心因性による口腔顔面領域の運動障害などのメカニズムの解明につながる可能性がある。ゆえに、(三叉神經中脳路核ニューロン) - Vsup ニューロン- VPMcvm ニューロン- GI への経路の解明を急ぐとともに、さらに GI から三叉神經中脳路核ニューロンへのフィードバック機構の解明、GI から他の脳部位への投射の解明につなげていきたいと考えている。