

原 著

成熟マウス *in vitro* 脳幹標本における顎二腹筋リズム活動の誘発

古 田 さおり

東京医科歯科大学歯学部歯科矯正学第一講座 (主任・指導: 相馬邦道教授)

東京医科歯科大学歯学部口腔生理学講座 (指導: 中村嘉男教授)

(1997 年 12 月 8 日受付)

Induction of Rhythmical Activity in Digastric Muscles in an *in vitro* Brainstem Preparation from Adult Mice

Saori Furuta

The First Department of Orthodontics, Faculty of Dentistry, Tokyo Medical and Dental University

(Chief and Director : Prof. Kunimichi Soma)

Department of Physiology, Faculty of Dentistry, Tokyo Medical and Dental University

(Director : Prof. Yoshio Nakamura)

In this study, it was attempted to induce masticatory movements in an *in vitro* brainstem-spinal cord preparation isolated together with the orofacial structure from adult mice.

The preparation was perfused intra-arterially with an artificial cerebrospinal fluid (ACSF) containing dextran through a cannula fixed to the descending aorta, and was placed in a bath perfused with the ACSF. Repetitive electrical stimulation of the medullary pyramidal tract (MPT) induced rhythmic EMG activities in the digastric muscle (3.8~7.2Hz). Bath and intra-arterial application of kynurenic acid (KYN) or D, L-2-amino-5-phosphonovaleric acid (APV) suppressed the rhythm. During application of KYN, the rhythmic EMG activity in the digastric muscle could not be induced, even though the intensity of stimulation was raised. On the other hand, during application of APV, stimulation at a higher intensity induced rhythmic EMG activities with a lower frequency and a smaller amplitude.

The results showed that glutamate is involved in induction of the rhythmic EMG activities by stimulation of the MPT, and that excitatory effects via the *N*-methyl-D-aspartic acid receptor is not indispensable for its induction.

I. 緒 言

哺乳類の生後発達の大きな特徴の1つとして、食物の形状が液体から固体へと変わることに伴う吸啜から咀嚼への移行が挙げられる。この移行期には、歯牙萌出¹⁾、顎骨や顎筋の成長発育²⁾、嚥下パタンの変化³⁾などの形態や機能の変化に加えて、脳内の神経伝達物質やイオンチャンネルの分布の変化^{4~6)}などの分子レベルでも大きな変化が生じている。ヒトでは一般的に乳歯の萌出に引き続いて吸啜運動から咀嚼運動への移行が起こると考えられている⁷⁾が、先天性の無歯顎症患者でも、生後半年になると、リズム性が不明瞭ながらも顎堤で固形物を咀嚼するようになることがしばしば認められる。また、出生時に

すでに永久歯列が完成しているモルモットにおいても、生後一定期間吸啜運動を行った後に咀嚼運動に移行する⁸⁾ことから、吸啜から咀嚼への移行には、末梢の形態や感覚機構の変化よりも中枢の神経機構の変化が本質的役割を果たしているものと考えられる。

吸啜と咀嚼運動のリズムは、呼吸^{9~13)}や歩行^{12,14,15)}と同様に、中枢性パタン発生器と呼ばれる神経機構で形成されると考えられており^{16,17)}、成熟動物を用いた *in vivo* 実験から、大脳皮質の皮質咀嚼野^{18~23)}や中脳網様体^{24,25)}、錐体路^{25~27)}の連続電気刺激により、自然の咀嚼運動に類似した顎と舌のリズミカルな協調運動が誘発されることが報告されている。ラットやマウスのように無歯顎で吸啜を開始し、出生時に錐体路の完成していない動物では、

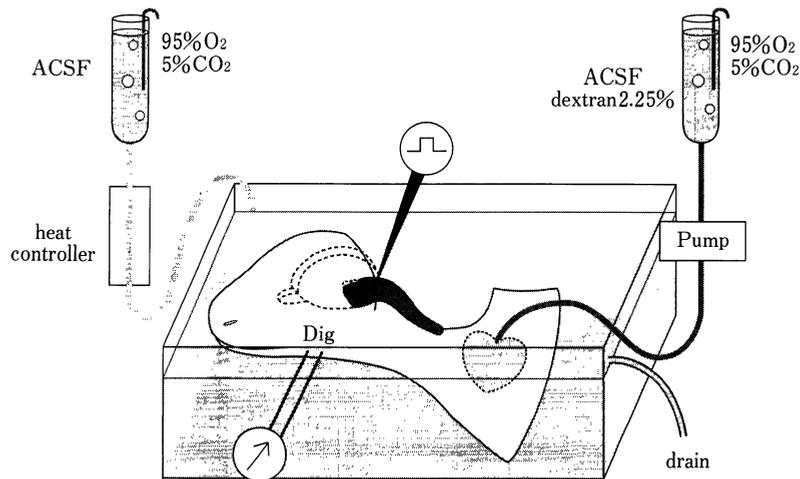


図1 実験模式図

記録槽は95%O₂-5%CO₂で飽和した人工脳脊髄液(ACSF):外液で灌流する。外液は重力により記録槽内に導き、液温は29~31℃に維持した。下行大動脈を介して内液(ACSF+2.25% dextran)を持続注入ポンプを用いて一定圧で灌流し、外液とともに水流ポンプにより排出した。同芯型双極電極を用いて延髄錐体路を刺激し、顎二腹筋前腹に刺入したエナメル被覆スチール電極により筋電図活動を記録した。

皮質刺激や錐体路刺激により吸啜運動を誘発することはできないが、新生仔 *in vitro* 摘出脳幹標本においては、興奮性神経伝達物質のグルタミン酸やそのアゴニストの一種 *N*-methyl-D-aspartic acid (NMDA) の灌流液中への投与により舌下神経に吸啜様リズムを誘発することができる²⁸⁾。したがって著者は、吸啜から咀嚼への移行のメカニズムの究明には、吸啜と咀嚼のパターン発生に必要な神経機構をすべて含み、顎顔面との連絡を保った *in vitro* 標本の開発が必要であると考えた。

そこで本研究においては、まず Paton の標本^{29,30)}を改良し、延髄錐体路の連続電気刺激により顎二腹筋にリズム活動を誘発することのできる、成熟マウス *in vitro* 脳幹標本の開発を行うこと、さらに、このリズム活動誘発に関与する伝達物質と受容体の検索を行うことを目的とした。

II. 方 法

実験には、生後30~50日齢のC57BL系マウス(14~20g)62匹を用いた。エーテル麻酔下で皮膚と上肢を除去した後、体幹を横隔膜の尾側で切断した。頭部と胸部は95%O₂-5%CO₂で飽和した0~5℃の人工脳脊髄液(外液:125mM NaCl, 24mM NaHCO₃, 5mM KCl, 2.6mM CaCl₂, 1.25mM MgSO₄, 1.25mM KH₂PO₄, 20mM glucose; 浸透圧300~320mOsm)を入れた手術槽内に浸した。頭頂骨、側頭骨、後頭骨の一部とその直下の硬膜、小脳を除去した後、上丘-下丘間で除脳した。

刺激電極挿入時に視野を妨げないように下丘背側半分も除去した。標本は背側面を上にして手術槽に固定し、横隔膜を切除後、下行大動脈を分離した。外径0.4~0.6mm、内径0.2~0.3mmのカニューレを下行大動脈に挿入し、95%O₂-5%CO₂で飽和し、血液凝固阻止薬 heparin sodium (0.05ml/g)を加えた0~5℃の人工脳脊髄液5mlを逆行性に注入し、切断した頸静脈から血液が排出することを確認した後、24~26℃の人工脳脊髄液(内液:外液に2.25%dextranを加えたもの)を持続注入ポンプを用いて一定圧(80~120mmHg, 20~50ml/min)で灌流した。手術槽の温度は30分から1時間かけて常温(24~26℃)まで戻した。顎二腹筋前腹に一对のエナメル被覆スチール電極(先端1.0mm露出、直径0.2mm)を刺入し、筋電図活動の記録電極とした。標本を記録槽に移した後、外液の温度を29~31℃まで上昇させ標本作製を完了した(図1)。なお、一部の実験では、外液温度を24~26℃に設定した。

脳幹背側より、脳幹正中部に脳幹背側表面に対して垂直に同芯型双極電極(直径0.2mm、中芯0.1mm、極間距離0.1mm)を挿入し、単発(矩形波、持続時間0.5ms, 90~200μA)ならびに連続電気刺激(33Hz)を行った。

リズムを誘発する刺激部位の検索範囲は、吻尾側方向には吻から下丘尾側端まで、外側には正中線から1.5mmまでとした。単発刺激を、錐体路の走行に沿って吻尾側および外側方向に0.25mmごと、深さは脳底部か

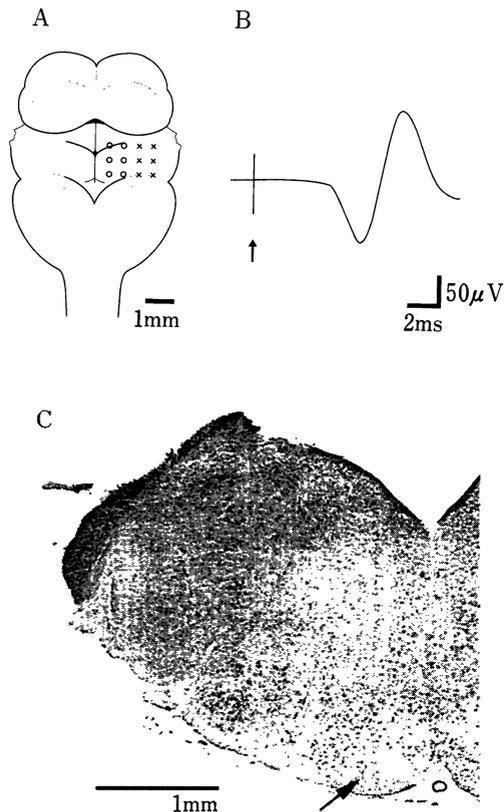


図2 刺激部位と単発刺激により顎二腹筋前腹に生じた筋電図活動

A. 脳幹正中線に沿って刺激部位の検索を行った。顎二腹筋前腹に発火活動を生じた部位を○, 生じなかった部位を×で示す。門より吻側に1.0 mm, 外側に0.5 mmの部位を刺激部位とした。

B. 単発刺激(持続時間0.5 ms, 120 μA)により顎二腹筋前腹に生じた筋電図活動5回を加算平均したもの。矢印は刺激時点を表す。

C. 刺激部位を示す前頭断組織標本。刺激部位を矢印で示す。

ら0.10 mm ごとに行い, 最も低い閾値で顎二腹筋筋電図活動を誘発する部位を検索した(図2 A, B)。

グルタミン酸の作動薬の一つであるNMDAの競合的拮抗薬, D, L-2-amino-5-phosphonovaleric acid (APV) 50 μM, またはグルタミン酸の広スペクトル拮抗薬, 4-hydroxyquinoline-2-carboxylic acid (kynurenic acid, KYN) 50 μM を外液に加えた。記録槽中の薬液濃度は内液で希釈されるため, 内液にも同濃度の薬液を溶解し, 連続刺激により誘発されたリズムに対する薬液投与の影響について検討した。この標本では6~8時間にわたり安定してリズム活動を記録することができた。実験終了後, 刺激電極を刺入したまま通電(200 μA, 15秒間)し, 微小破壊巣を作製して脳幹を摘出した。10% paraformaldehyde で3日間固定後, 厚さ60 μmの前頭断連

続凍結切片標本を作製し, creasy violet 染色を施し, 刺激部位を組織学的に確認した(図2 C)。

一部の実験にはエーテル麻醉下で *in vivo* 標本を用いた。ketamine hydrochloride (100 mg/kg, 筋注) 麻醉下で両側顎二腹筋前腹を露出し, 一对のエナメル被覆スチール電極を刺入して筋電図活動の記録電極とした。大脳皮質刺激電極刺入のために前頭骨, 側頭骨, 後頭骨の一部とその直下の硬膜を除去し, 大脳皮質背側面を露出した。硬膜除去後は, 生理的食塩水で浸した綿片で脳表面を覆い, 乾燥を防いだ。頭部を定位固定装置に固定した後, Ag-AgCl 板を不関電極として左側頸筋と皮膚との間に置き手術を終了した。リズムの誘発にはエナメル被覆タングステン単極電極を介して, 連続電気刺激(25~33 Hz, 持続時間0.5 ms, 30~100 μA)を行った。

すべての記録はPCM データレコーダー (TEAC RD 180 T, サンプリング周波数10 kHz) に記録した。データ解析は, 1~10 kHzの帯域濾波器を介してMaclab/8s Scope 3.4 (AD Instrument 社製) を用いてPower Macintosh 8100に取り込んだ(サンプリング周波数40 kHz)。連続刺激により誘発された活動がリズムカルな活動であることは, 筋電図活動の自己相関ヒストグラムを用いて判定した。すなわち, それぞれの刺激に対し, 各刺激後4~6 msの潜時で40 μV以上の振幅の活動が認められたものについて, 連続した応答100回分(間隔30 ms)の自己相関ヒストグラムを作製し, 等倍の時間間隔でピークを認めた場合を周期性を持つ活動とみなした。

III. 結 果

1. 顎二腹筋に誘発されたリズム活動

脳幹正中部の錐体路の走行に沿った吻尾側方向の部位の単発刺激により, 顎二腹筋筋電図に同側では4.5~5.2 ms(平均4.73 ms, n=4), 反対側では3.6~4.1 ms(平均3.86 ms, n=4)の潜時で活動が誘発された(図2 A, B)。そのなかでも門より1.0 mm吻側, 正中から0.5 mm外側, 脳底部から0.5 mm背側の部位で活動誘発のための閾値が最低であったので, 同部位を刺激部位とした。この部位の連続刺激は, 左右顎二腹筋前腹に, 同期してリズムカルな筋電図活動を誘発した。このリズムカルな群発活動は, 各刺激パルスに対して短潜時で誘発される筋電図活動の振幅が, 徐々に増大した後, 徐々に減少する(漸増漸減)パターンを示す場合(図3 Bb, 図4, 図7)と, 振幅自体には顕著な差はなく, ほぼ同一の振幅の筋電図活動の群発を示す場合(図5, 図8)とがあった。このリズムの頻度は, 外液の温度が24~26℃では3.8~5.5 Hz(平均4.6 Hz, n=5), 29~31℃では6.7~7.2 Hz(平均6.9 Hz, n=10)であり, 外液温度が

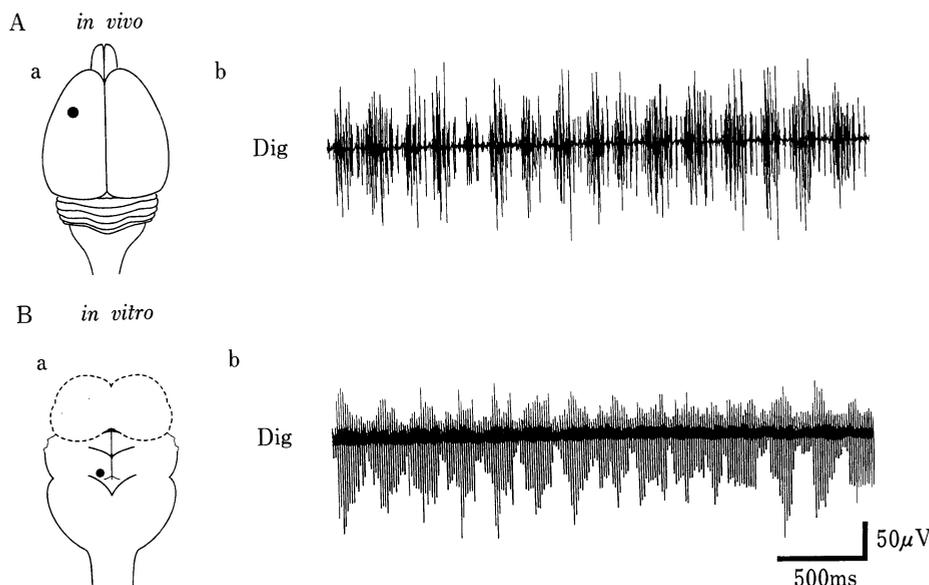


図3 大脳皮質 (*in vivo*) と延髄錐体路 (*in vitro*) の連続電気刺激により顎二腹筋前腹に誘発されたリズム活動

A. a: 大脳皮質の背側面の模式図。刺激 (33 Hz, 0.5 ms, 30 μ A) 部位を●印で示す (大脳皮質吻側端より 2.9 mm 尾側, 正中より 2.8 mm 外側), b: 右側顎二腹筋前腹に誘発されたリズムミカルな筋電図活動

B. a: 脳幹の背側面の模式図。刺激 (33 Hz, 0.5 ms, 200 μ A) 部位を●印で示す (吻より 1.5 mm 吻側, 0.5 mm 外側), b: 右側顎二腹筋前腹に誘発されたリズムミカルな筋電図活動

低いと有意に周期が長かった ($p < 0.05$, Mann-Whitney's U test)。

in vivo 標本においては, 大脳皮質質咀嚼野(大脳皮質吻側端より 2.9 mm 尾側, 正中より 2.8 mm 外側) の連続刺激により, 左右顎二腹筋前腹に同期して 5.1~7.5 Hz(平均 6.5 Hz, $n = 3$) のリズム活動が誘発された(図 3 Ab)。

2. 顎二腹筋に誘発されたリズム活動に対するキヌレン酸(KYN)の効果

グルタミン酸 (30~50 μ M) および NMDA (30~50 μ M) の外液および内液への投与により, 顎二腹筋前腹にリズム活動を誘発することはできなかった。KYN (50 μ M) を外液および内液に投与中に錐体路を連続刺激すると, 投与前(図 4, 最上段)で見られたリズム活動は誘発されなかった(図 4, 2段目)。刺激強度を投与前に対し 3.0~8.3% (平均 5.1%, $n = 7$) 増大すると活動自体は出現したが(図 4, 3段目), 刺激強度を 200 μ A まで増大 (42.9~72.4%, $n = 7$) させても投与前と同様のリズムは生じなかった。

漸増漸減型パタンの群発活動を示す標本ではリズムの開始時点を正確に計測できないため, リズミカルな群発を形成する筋電図活動が顕著な振幅の漸増漸減を示さずに誘発された標本 ($n = 6$) (図 5) で, 連続刺激各パル

スにより誘発された活動の自己相関を検索した。図 6 にその結果の 1 例を示す。投与前 (control, ○印) は, ほぼ 240 ms ごとにピークを持つリズムミカルな活動が認められる。一度応答してから 30 ms 後に続けて応答したものは 77% であった。KYN 投与时 (■印) には, リズム活動は消失し一度応答してから 30 ms 後に応答したのは 13% にすぎなかった。通常の外液と内液に戻してから 30 分後 (recovery, △印) では, 再びほぼ 240 ms ごとにピークを持つリズムミカルな活動が出現した。

3. 顎二腹筋に誘発されたリズム活動に対する APV の効果

APV (50 μ M) を外液および内液に投与中に錐体路を連続刺激すると, 投与前 (図 7, 最上段) で見られたリズム活動は誘発できなかった(図 7, 2段目)。刺激強度を投与前に対し 2.2~6.7% (平均 3.4%, $n = 10$) 増大させたところ振幅は 41.6~74.2% (平均 51.6%) 減少し, 周期の延長したリズム活動が認められた(図 7, 3段目)。リズムの周期については, KYN の効果を検索した場合と同様に, 明瞭な漸増漸減型パターンを示さずにリズムミカルな群発活動が生じた標本 ($n = 8$) (図 8) で, 連続刺激により誘発された活動の自己相関を検索した。図 9 はその結果の 1 例を示す。投与前 (control, ○印) では, ほぼ 240 ms ごとにピークを持つリズムミカルな活動を

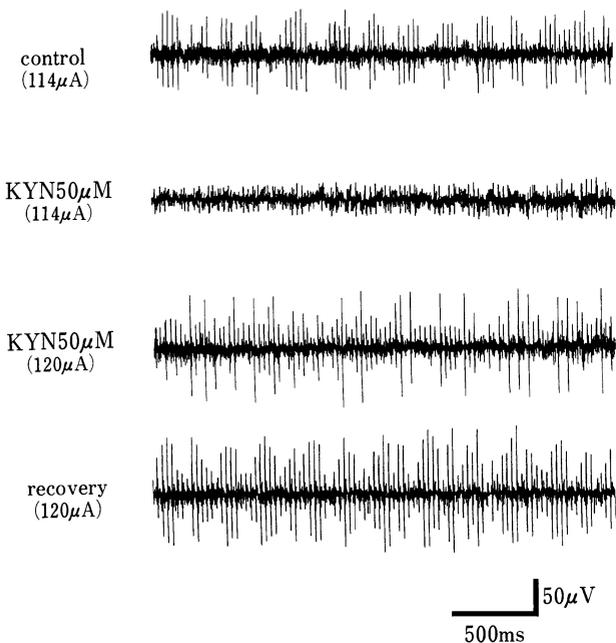


図 4 顎二腹筋リズム活動に対するキヌレン酸 (KYN) の効果

左側延髄錐体路連続刺激 (33 Hz, 0.5 ms, 114 μ A) により右側顎二腹筋前腹に生じたりズム活動。上段から投与前, KYN (50 μ M) 投与中, KYN 投与中刺激強度を増大したとき (120 μ A), 通常人工脳脊髄液 (外液, 内液) に戻してから 30 分後 (120 μ A) の記録と, それぞれの刺激強度を示す。

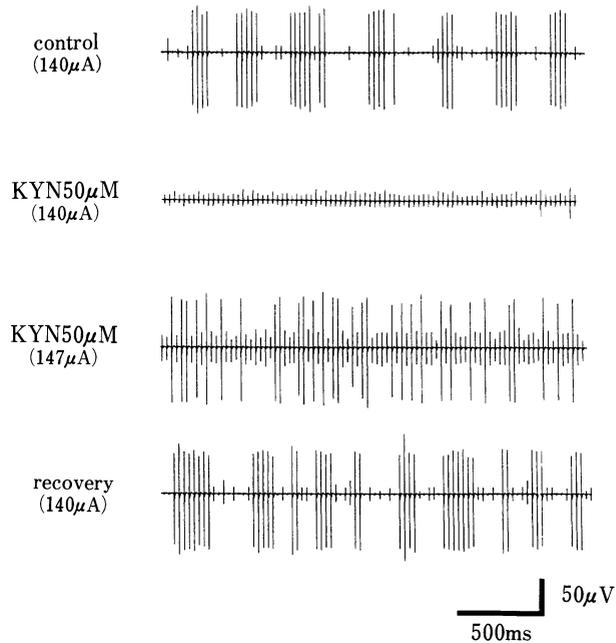


図 5 顎二腹筋リズム活動に対するキヌレン酸 (KYN) の効果

左側延髄錐体路連続刺激 (33 Hz, 0.5 ms, 140 μ A) により, 右側顎二腹筋前腹に誘発されたりズムカルな群発活動。漸増漸減型のパターンを示していない。上段から投与前, KYN (50 μ M) 投与中, KYN 投与中刺激強度を増大したとき (147 μ A), 通常人工脳脊髄液 (外液, 内液) に戻してから 30 分後 (140 μ A) の記録と, それぞれの刺激強度を示す。

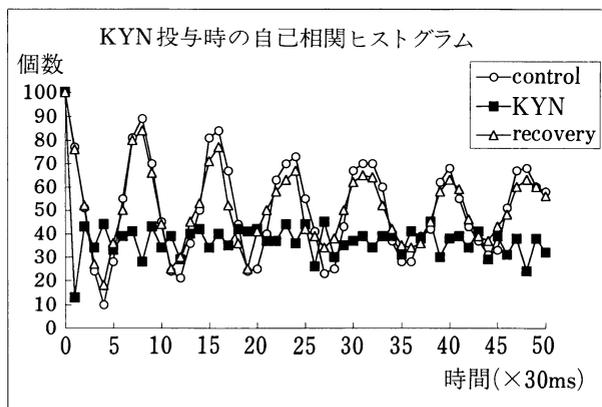


図 6 顎二腹筋筋電図活動の自己相関ヒストグラム-キヌレン酸 (KYN) の効果

各連続刺激後 4 ~ 6 ms の潜時で 40 μ V 以上の振幅の活動が認められたものについて, 連続した応答 100 回分 (間隔 30 ms) の自己相関ヒストグラム

投与前: \circ , ほぼ 240 ms ごとにピークを持つリズムカルな活動を示す。

KYN (50 μ M) 投与中刺激強度を増大した場合: \blacksquare , 一定の周期を持つ明らかなピークは認められなかった。

通常人工脳脊髄液 (外液, 内液) に戻してから 30 分後: \triangle , 再びほぼ 240 ms ごとにピークを持つリズムカルな活動が出現した。

す。APV 投与時 (\blacksquare 印) には 390 ms ごとにピークを持つリズムカルな活動に変化した。通常の外液と内液に戻してから 30 分後 (recovery, \triangle 印) では, 再びほぼ 240 ms ごとにピークを持つリズムカルな活動が出現した。平均周期は, 24~26 $^{\circ}$ C では投与前 3.8~5.5 Hz (平均 4.6 Hz, n=3) が, APV 投与時には 2.7~4.9 Hz (平均 3.9 Hz) に, 29~31 $^{\circ}$ C では投与前 6.7~7.2 Hz (平均 7.0 Hz, n=5) が APV 投与時には 5.8~6.8 Hz (平均 6.2 Hz) に変化した。図 10 は一度群発活動が生じてから次の群発活動が生じるまでの時間 (平均周期) を計測し, 投与前の平均周期に対する APV 投与時の平均周期の変化を相対値で示した。APV 投与時の周期は, 投与前の周期の 1.2~1.8 倍 (平均 1.5 倍) で投与前に対し有意に増加し, 周期が長くなった (p<0.05, Wilcoxon signed-ranks test)。

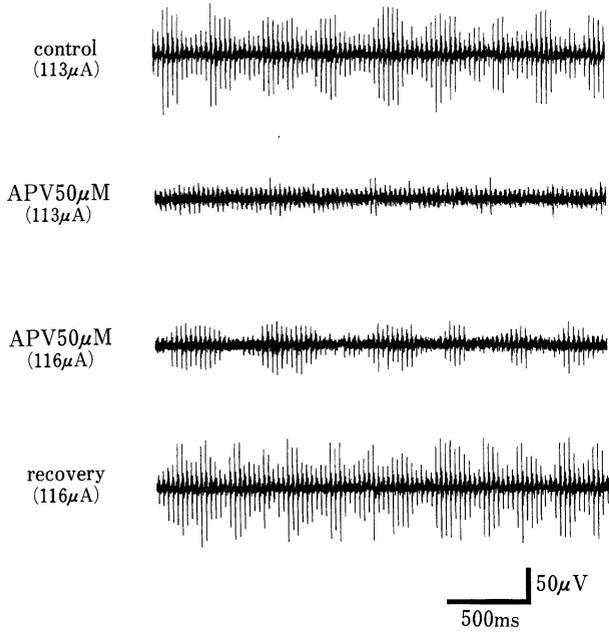


図7 顎二腹筋リズム活動に対する APV の効果

左側延髄錐体路連続刺激 (33 Hz, 0.5 ms, 113 μ A) により右側顎二腹筋前腹に生じたリズム活動。上段から投与前, APV (50 μ M) 投与中, APV 投与中刺激強度を増大させたとき (116 μ A), 通常人工脳脊髄液 (外液, 内液) に戻してから 30 分後 (116 μ A) の記録と, それぞれの刺激強度を示す。

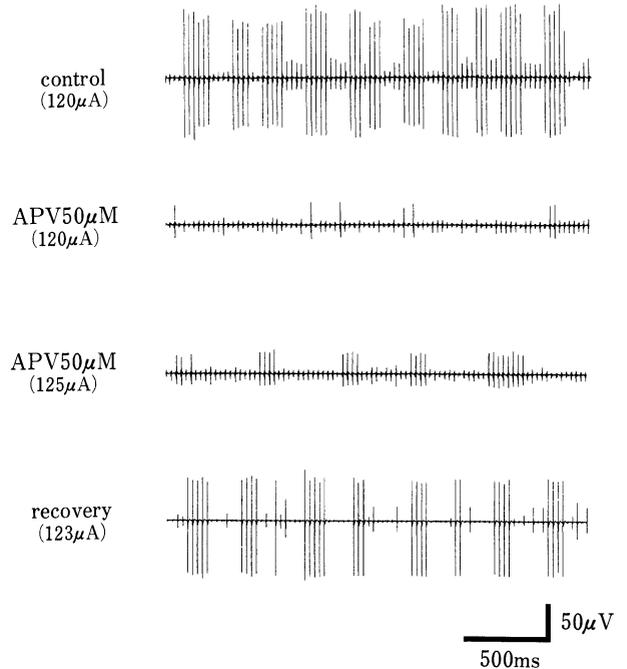


図8 顎二腹筋リズム活動に対する APV の効果

左側延髄錐体路連続刺激 (33 Hz, 0.5 ms, 120 μ A) により, 右側顎二腹筋前腹に誘発されたリズム活動。漸増漸減型のパターンを示していない。上段から投与前, APV (50 μ M) 投与中, APV 投与中刺激強度を増大したとき (125 μ A), 通常人工脳脊髄液 (外液, 内液) に戻してから 30 分後 (123 μ A) の記録と, それぞれの刺激強度を示す。

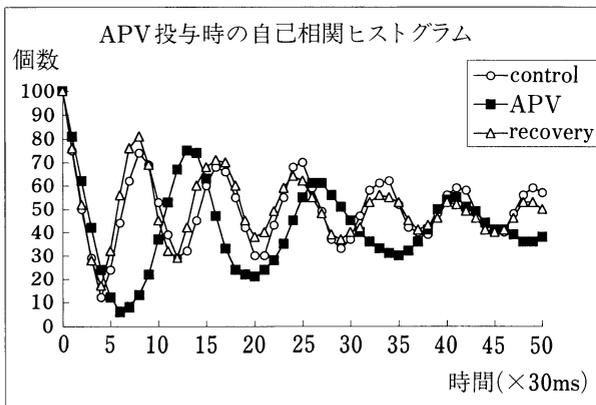


図9 顎二腹筋筋電図活動の自己相関ヒストグラム-APV の効果

投与前: ○, ほぼ 240 ms ごとにピークを持つリズム活動を示す。
 APV (50 μ M) 投与中刺激強度を増大した場合: ■, 390ms ごとにピークを持つリズム活動に変化した。
 通常人工脳脊髄液 (外液, 内液) に戻してから 30 分後: △, 再びほぼ 240 ms ごとにピークを持つリズム活動が出現した。

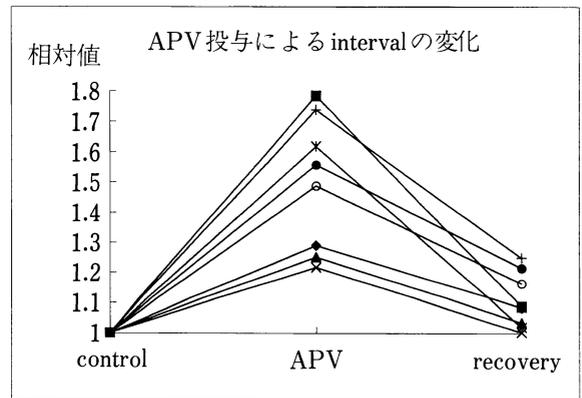


図10 APV 投与による周期の変化

群発活動開始から, 次の群発活動開始までの時間を計測し, APV 投与による周期変化を投与前の平均周期に対する相対値で表してある。

IV. 考 察

1. 成熟マウス *in vitro* 脳幹標本

in vitro 標本は細胞外環境がコントロールしやすく、長時間安定して単一ニューロンの細胞内あるいは細胞外記録することができるが、酸素とグルコースの補給を灌流液からの拡散に依存しているため、無酸素状態に抵抗力のある生後 0～4 日の新生仔しか利用できない。したがって、これまでに吸啜様活動を誘発できるラット新生仔 *in vitro* 摘出脳幹標本は開発されている²⁸⁾が、成熟動物で顎顔面器官のリズム活動を誘発できる *in vitro* 標本は、開発されていなかった。これは、これまでの成熟動物における *in vitro* 標本が、吸啜あるいは咀嚼活動を形成する神経機構全体を含んでいないものか³¹⁻³³⁾、あるいは標本作製時に上下顎、舌との関係が絶たれてしまうもの³⁴⁾であったためである。Paton が開発した成熟マウスにおける *in vitro* 標本は、下行大動脈より逆行性に人工脳脊髄液を灌流することにより、生後 21～42 日齢のマウスにおいて、自発性吸息活動を記録できることが報告されている^{29,30)}。この標本の脳幹は上丘尾側端で切断され、頭蓋骨から摘出されていない。そこで今回は、脳幹背側を広く露出することにより錐体路刺激が可能で、顎顔面器官との連絡を保持することにより同部位のリズム活動を誘発できる、成熟マウス *in vitro* 脳幹標本を開発した。マウスはラットに比べ出生時の成熟度が高く、脳容積が小さいことから拡散距離の短い点で有利であり、さらに遺伝子操作ができることから、今後生理学的研究に広く用いられるようになると思われる。

この標本の錐体路単発電気刺激により、顎二腹筋前腹に筋電図活動が誘発された。この潜時は同側に比べ反対側が平均 0.95 ms 短かかった。これは、モルモットにおいて、錐体路を単発あるいは短時間連発刺激した際に顎二腹筋前腹に生じた筋電図活動が、同側に比べ反対側が短いという報告と一致している²²⁾。

連続刺激では、リズムカルな群発活動が誘発された。また、このリズムは灌流液の温度の影響を受けやすく、外液温度の上昇に伴い頻度が増加したが、これはほかの *in vitro* 標本で見られる現象である^{30,35)}。

2. 顎二腹筋リズム活動に対するグルタミン酸の役割

in vitro 標本では、記録槽の人工脳脊髄液中に薬液を投与することにより、容易に細胞外環境を変えてその効果を知ることができる。その特徴を生かして、単発刺激により誘発された発火活動と、連続刺激により誘発されたリズム活動に対する KYN と APV の影響について検討した。今回の実験では 50 μ M の KYN と APV を用いた。モルモットにおいて同濃度の KYN と APV の局所投与が、皮質短潜時連発刺激による顎二腹筋筋電図活動

を十分抑制しており³⁶⁾、今回用いたマウスはモルモットに比べ脳容積が小さく、灌流液中(外液)と血管内(内液)の双方に薬液を投与していることから、50 μ M の濃度は、その薬液効果を検討するのに十分な濃度であったと考えられる。

グルタミン酸はリズム活動に関連したリズムカルな群発活動の開始や維持に関与し、脊椎動物の中樞神経系に著明な興奮作用を示すことが知られている^{14,37,38)}。*in vitro* 脊髄標本を用いた実験で、グルタミン酸あるいは NMDA を灌流液中に投与すると脊髄前根に歩行動動に対応する神経活動が誘発され^{12,14,15)}、摘出脳幹標本に投与すると舌下神経に吸啜様リズム活動が誘発される²⁸⁾。モルモットにおいて中脳網様体へのグルタミン酸の局所投与によっても咀嚼様活動が誘発されることが報告されている²⁴⁾が、今回開発した脳幹標本ではグルタミン酸や NMDA の灌流液投与によりリズム活動を誘発することはできなかった。これは今回の標本では上丘-下丘間で切断しているため中脳網様体が除去され、その部位のニューロン活動のインパルスが遮断されたために咀嚼リズムを誘発できなかったのかもしれない。

皮質連続刺激による咀嚼様活動誘発時に、閉口筋運動ニューロンは NMDA タイプと non-NMDA タイプの両方の受容体を介して興奮性入力とグリシンによる抑制性入力を受けるが、開口筋ニューロンは主に non-NMDA タイプの受容体を介してリズムカルな興奮性入力を受けるとの報告がある³⁹⁾。今回、錐体路連続刺激により顎二腹筋前腹に生じたりズム活動は KYN の投与により消失した。刺激強度を増大させることにより潜時の短い発火活動が生じたが、投与前に見られたリズム活動は生じなかった。また、APV の投与では投与前に見られたリズム活動は消失したが、刺激強度を増大させたところ、振幅は減少し頻度は低下するもののリズム活動自体は誘発された。これは錐体路連続刺激により顎二腹筋前腹に生じたりズム活動の発生に、グルタミン酸による興奮性入力が必要な役割を呈していることを示すとともに、NMDA タイプの受容体が必須ではないことも示している。

3. 顎二腹筋リズム活動

今回開発した成熟マウス *in vitro* 脳幹標本において、錐体路の連続刺激により顎二腹筋にリズムカルな筋電図活動を誘発することができた。ラットにおいて顎二腹筋前腹は下顎の下制と後方移動に作用することから⁴⁰⁾、マウスにおいても同様の開口運動を誘発したと考えられる。マウスにおいてリズムカルな開口運動を生じる運動としては、呼吸運動、嚥下運動、咀嚼運動、吸啜運動などが考えられるが、この暦齢のマウスはすでに歯牙萌出が完了し、固形食物を摂取しているため、吸啜運動では

ないと考えられる。Paton は、呼吸運動は 31°C の実験条件で自発性に約 1 Hz の頻度で生じると報告している^{39,30}が、今回の標本において生じたりズム (平均 6.9 Hz, 29~31°C) よりはるかに遅い。嚥下運動時には陰圧を作る際に顎二腹筋が活動する可能性があるが、嚥下のリズム発生には non-NMDA タイプと NMDA タイプの両方の受容体が必要であるとの報告がある⁴¹。今回の実験で生じたりズム活動には NMDA タイプの受容体は必須ではないことから、嚥下運動ではないと考えられる。*in vivo* 標本において、皮質刺激により誘発された咀嚼様活動と同様の顎運動が錐体路刺激により誘発されるという報告がある^{25~27}。今回用いた *in vitro* 標本には錐体路と、咀嚼パターン発生器が存在すると考えられている下位脳幹²²が残されていることから、誘発されたりズム活動が咀嚼様活動である可能性が高い。今回誘発された活動が咀嚼様活動であるかどうか検討するためには、今後、咀嚼様活動に特徴的な閉口筋と開口筋との交代性の活動が生じるか検討する必要があると考えられる。

今回錐体路連続刺激によって誘発されたりズム活動には、*in vivo* 標本における皮質刺激時と同様に筋電図活動の振幅が漸増漸減型のパターンを示すものと、振幅に顕著な相違が認められないものとがあった。大脳皮質の連続刺激により顎二腹筋にリズムカルな筋電図活動を誘発する機構については、リズムカルな群発活動が、個々の皮質刺激に対して短潜時で誘発され、振幅が漸増漸減する一連の活動から構成されることに基づいて、Goldberg らは以下のような説を提唱した^{42,43}。“皮質の単発刺激は、少数のシナプスを介して短潜時で顎二腹筋運動ニューロンを興奮させる。皮質の連続刺激は、この短潜時の経路を介して顎二腹筋運動ニューロンを興奮させると同時に、時間的加重によって中枢パターン発生器を活性化させる。この中枢パターン発生器からのリズムカルな興奮性出力は、直接顎二腹筋運動ニューロンに送られるのではなく、短潜時の経路のシナプス伝達効率をリズムカルかつ交代性に促通および抑制する。このため、皮質から顎二腹筋運動ニューロンへ供給される興奮性入力はリズムカルに増減し、その結果、これに一致して興奮する顎二腹筋運動ニューロンの数が増減するので、顎二腹筋筋電図の群発活動は、短潜時の活動の振幅が漸増漸減するパターンを呈する”。この中枢パターン発生器の出力が漸増漸減型から全か無かに近いパターンに変化したために、運動ニューロンへの入力パターンが変化し、顎二腹筋における筋電図活動の振幅が著明な変化を呈さなかったのかもしれない。また、動員閾値の高い顎二腹筋運動ニューロンの動員閾値が低下し、動員閾値の低い運動ニューロンとほぼ同一の入力に対して同時に興奮した可能性もある。この場合は、運動ニューロンへの入力のパターンが同じで

あっても、弱い入力に対して多数のニューロンが同時に発火するため、筋電図活動の振幅が著明な変化を生じなかったのかもしれない。

4. 生後発達

呼吸のように出生時にある程度完成していると思われるパターン発生器も、生後発達に伴いリズム発生に必要な入力が増え、抑制性入力を含む複雑なネットワークへと変化すると考えられている^{32,33,44,45}。同様に吸啜運動のパターン発生器も出生時に完成された状態ではなく、生後発達に伴い複雑に変化すると考えられる。吸啜リズムの発生に NMDA が重要である^{28,46}という報告に対し、皮質刺激誘発咀嚼様活動の発生時には閉口筋運動ニューロンへの入力の伝達には、グルタミン酸による興奮性入力とグリシンによる抑制性入力が必要であり、開口筋においてはそのなかでも non-NMDA タイプが重要であると考えられている⁴¹。このように、咀嚼様活動のリズム発生には吸啜様活動のリズム発生に比べ、はるかに複雑な神経機構が必要とされると考えられる。この転換の機構は中枢神経機構が本質的役割を担っていると考えられるが、顎顔面器官の生後発達や、歯牙萌出による顎口腔領域からの感覚入力の増大が、中枢神経回路の可塑的変化の促進や変化した結果を維持するために必要である可能性が大きい。モルモットにおいては新生仔において吸啜運動を誘発できる皮質吸啜野と成熟動物における皮質咀嚼野が異なっている⁸という報告があるが、生後、歯牙の萌出時に吸啜から咀嚼への移行が起こる動物において、吸啜と咀嚼のパターン発生器が同一のものであるのか、全く別個のものであるのかに関する報告はなく、また、その転換が生後発達のどの時期において起こるのかということは、いまだ解明されていない。今回開発した成熟マウス *in vitro* 脳幹標本は、暦齢を下げることで吸啜運動を誘発できる可能性があり、歯牙萌出、顎筋の生後発達を伴う口腔顔面領域の変化が吸啜から咀嚼への移行に与える影響について検索できる可能性がある。したがって、本研究で開発された *in vitro* 脳幹標本は、この転換のメカニズム、咀嚼運動の確立のメカニズムを知るうえできわめて有効な標本であると思われる。

V. 要約と結論

1. 成熟マウスにおいて顎顔面器官との連絡を保持したまま脳幹を摘出し、この標本の外側の灌流液ならびに血管系を介して酸素とグルコースを供給することにより、長時間にわたって顎筋にリズム活動を誘発できる *in vitro* 脳幹標本を開発した。

2. この標本では延髄錐体路単発電気刺激により顎二腹筋前腹に筋電図活動が誘発され、連続刺激により顎二

腹筋前腹にリズムカルな筋電図活動が誘発された。この活動は、*in vivo* 標本において大脳皮質連続刺激により顎二腹筋前腹に生じた咀嚼様活動と類似していた。

3. このリズムは KYN 投与により消失したが、APV 投与では、リズム活動の振幅の減少と頻度の低下が生じたものの、リズム活動自体は残存した。このことは、延髄錐体路刺激によって誘発される顎二腹筋リズム活動の発生にはグルタミン酸が必須であるが、NMDA 受容体を介する作用はそのリズム発生に必須ではないことを示している。

4. 吸啜様リズム活動の誘発に NMDA 受容体を介する興奮性シナプス伝達が必要であることを考慮すると、本研究の結果から、吸啜から咀嚼への転換に伴い、これらのリズム活動発生に関する中枢神経機構に著しい再構成が起きていることが示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、終始ご懇篤なるご指導、ご校閲を賜りました東京医科歯科大学大学歯学部口腔生理学講座中村嘉男教授、ならびに歯科矯正学第一講座 相馬邦道教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究に懇切なるご教示、ご校閲くださった口腔生理学講座 片倉伸郎助手に心より感謝いたします。さらに、終始温かいご支援、ご協力をいただきました、口腔生理学講座ならびに歯科矯正学第一講座の諸先生方に厚くお礼申し上げます。

本研究の要旨の一部は、第 74 回日本生理学会大会(1997 年 3 月 27 日、浜松)において発表した。

文 献

- 1) Inuma, M., Yoshida, S. and Funakoshi, M. : Development of masticatory muscles and oral behavior from suckling to chewing in dogs. *Comp. Biochem. Physiol.* 100 A : 789-794, 1991.
- 2) Kubota, K., Narita, N., Ohkubo, K., Shibana, S., Nagae, K., Kubota, M., Odagiri, N. and Kawamoto, T. : Morphological studies of the neuromuscular mechanism shifting from sucking to biting of mice. *Acta Anat.* 133 : 200-208, 1988.
- 3) Moyers, R. E. : The infantile swallow. *Tr. Europ. Orthod. Soc.* 40 : 180-187, 1964.
- 4) Watanabe, M., Inoue, Y., Sakimura, K. and Mishina, M. : Developmental changes in distribution of NMDA receptor channel subunit mRNAs. *NeuroReport.* 3 : 1138-1140, 1992.
- 5) Wisden, W. and Seeburg, P. H. : A complex mosaic of high-affinity kainate receptors in rat brain. *J. Neurosci.* 13 : 3582-3598, 1993.
- 6) Sahara, Y., Noro, N., Iida, Y., Soma, K. and Nakamura, Y. : Glutamate receptor subunits GluR 5 and KA-2 are coexpressed in rat trigeminal ganglion neurons. *J. Neurosci.* 17 : 6611-6620, 1997.
- 7) Moyers, R. E. : Maturation of orofacial musculature. In : *Handbook of Orthodontics*. 3rd ed.. Chicago, 1973, Year Book Medical, 135.
- 8) Iriki, A., Nozaki, S. and Nakamura, Y. : Feeding behavior in mammals : corticobulbar projection is reorganized during conversion from sucking to chewing. *Brain Res.* 44 : 189-196, 1988.
- 9) Suzue, T. : Respiratory rhythm generation in the *in vitro* brain stem-spinal cord preparation of neonatal rat. *J. Physiol.* 354 : 173-183, 1984.
- 10) Walton, K. and Llinas, R. : An isolated *in vitro* preparation of the neonatal rat brainstem and spinal cord. *Soc. Neurosci. Abstr.* 11 : 29, 1985.
- 11) Harada, Y., Kuno, M. and Wang, Y. Z. : Differential effects of carbon dioxide and pH on central chemoreceptors in the rat *in vitro*. *J. Physiol.* 368 : 679-693, 1986.
- 12) Smith, J. C. and Feldman, J. L. : *In vitro* brainstem-spinal cord preparations for study of motor systems for mammalian respiration and locomotion. *J. Neurosci. Meth.* 21 : 321-333, 1987.
- 13) Onimaru, H., Arata, A. and Homma, I. : Localization of respiratory rhythm-generating neurons in the medulla of brainstem-spinal cord preparations from newborn rats. *Neurosci. Lett.* 78 : 151-155, 1987.
- 14) Kudo, N. and Yamada, T. : N-methyl-D, L-aspartate-induced locomotor activity in a spinal cord-hindlimb muscles preparation of the newborn rat studied *in vitro*. *Neurosci. Lett.* 75 : 43-48, 1987.
- 15) Smith, J. C., Feldman, J. L. and Schmidt, B. J. : Neural mechanisms generating locomotion studied in mammalian brain stem-spinal cord *in vitro*. *FASEB J.* 2 : 2283-2288, 1988.
- 16) Nakamura, Y., Kubo, Y., Nozaki, S. and Takatori, M. : Cortically induced masticatory rhythm and its modification by tonic peripheral inputs in immobilized cats. *Bull. Tokyo Med. Dent. Univ.* 23 : 101-107, 1976.
- 17) Nakamura, Y. and Kubo, Y. : Masticatory rhythm in intracellular potential of trigeminal motoneurons induced by stimulation of orbital cortex and amygdala in cats. *Brain Res.* 148 : 504-509, 1978.
- 18) Morimoto, T. and Kawamura, Y. : Properties of tongue and jaw movements elicited by stimulation of the orbital gyrus in the cat. *Archs. Oral Biol.* 18 : 361-372, 1973.
- 19) Kawamura, Y. and Tsukamoto, S. : Analysis of jaw movements from the cortical jaw motor area and amygdala. *Jpn. J. Physiol.* 10 : 471-488, 1960.
- 20) Dellow, P. G. and Lund, J. P. : Evidence for central timing of rhythmical mastication. *J. Physiol.* 215 : 1-13, 1971.
- 21) Goldberg, L. J. and Tal, M. : Intracellular recording in trigeminal motoneurons of the anesthetized guinea pig during rhythmic jaw movements. *Exp. Neurol.* 58 : 102-111, 1978.
- 22) Nozaki, S., Iriki, A. and Nakamura, Y. : Localization of central rhythm generator involved in cortically induced rhythmical masticatory jaw-opening movement in the guinea pig. *J. Neurophysiol.* 55 : 806-825, 1986.
- 23) Sasamoto, K., Zhang, G. and Iwasaki, M. : Two types of rhythmical jaw movements evoked by stimulation of the rat cortex. *Jpn. J. Oral Biol.* 32 : 57-68, 1990.
- 24) Hashimoto, N., Katayama, T., Ishiwata, Y. and Na-

- kamura, Y. : Induction of rhythmic jaw movements by stimulation of the mesencephalic reticular formation in the guinea pig. *J. Neurosci.* 9 : 2887-2901, 1989.
- 25) Lund, J. P. and Dellow, P. G. : The influence of interactive stimuli on rhythmical masticatory movements in rabbits. *Archs. oral Biol.* 16 : 215-223, 1971.
- 26) Morimoto, T., Inoue, T. and Nagashima, T. : Sensory components facilitating jaw-closing muscle activities in the rabbit. *Exp. Brain Res.* 76 : 424-440, 1989.
- 27) Nozaki, S., Iriki, A. and Nakamura, Y. : Role of corticobulbar projection neurons in cortically induced rhythmical masticatory jaw-opening movement in the guinea pig. *J. Neurophysiol.* 55 : 826-845, 1986.
- 28) Katakura, N., Jia, L. and Nakamura, Y. : NMDA-induced rhythmical activity in XII nerve of isolated CNS from newborn rats. *NeuroReport* 6 : 601-604, 1995.
- 29) Paton, J. F. : A working heart-brainstem preparation of the mouse. *J. Neurosci. Meth.* 65 : 63-68, 1996.
- 30) Paton, J. F. : The ventral medullary respiratory network of the mature mouse studied in a working heart-brainstem preparation. *J. Physiol.* 493 : 819-831, 1996.
- 31) Funk, G. D., Smith, J. C. and Feldman, J. L. : Generation and transmission of respiratory oscillations in medullary slices : role of excitatory amino acids. *J. Neurophysiol.* 70 : 1497-1515, 1993.
- 32) Paton, J. F., Ramirez, J. M. and Richter, D. W. : Functionally intact *in vitro* preparation generating respiratory activity in neonatal and mature mammals. *Pflugers Arch.* 428 : 250-260, 1994.
- 33) Ramirez, J. M., Quellmalz, U. J. and Richter, D. W. : Postnatal changes in the mammalian respiratory network as revealed by the transverse brainstem slice of mice. *J. Physiol.* 491 : 799-812, 1994.
- 34) Llinas, R., Yarom, Y. and Suhimori, M. : Isolated mammalian brain *in vitro* : new technique for analysis of electrical activity of neuronal circuit function. *Fed. Proc.* 40 : 2242-2245, 1981.
- 35) Onimaru, H. and Homma, I. : Respiratory rhythm generator neurons in medulla of brainstem-spinal cord preparation from newborn rat. *Brain Res.* 403 : 380-384, 1987.
- 36) Katakura, N. and Chandler, S. H. : 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, 1990.
- 37) Poon, M. : Induction of swimming in lamprey by L-DOPA and amino acids. *J. Comp. Physiol.* 136 : 337-344, 1980.
- 38) Brodin, L. and Grillner, S. : The role of putative excitatory amino acid neurotransmitters in the initiation of locomotion in the lamprey spinal cord. I. The effects of excitatory amino acid antagonists. *Brain Res.* 360 : 139-148, 1985.
- 39) Inoue, T., Chandler, S. H. and Goldberg, L. J. : Neuropharmacological mechanisms underlying rhythmical discharge in trigeminal interneurons during fictive mastication. *J. Neurophysiol.* 71 : 2061-2073, 1994.
- 40) Hiiemäe, K. M. : Masticatory Function in the Mammals. *J. Dent. Res. Suppl.* 5 : 883-893, 1967.
- 41) Kessler, J. P., Cherkaoui, N., Catalin, D. and Jean, A. : Swallowing responses induced by microinjection of glutamate and glutamate agonists into the nucleus tractus solitarius of ketamine-anesthetized rats. *Exp. Brain Res.* 83 : 151-158, 1990.
- 42) Goldberg, L. J., Chandler, S. H. and Tal, M. : 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, 1982.
- 43) Chandler, S. H. and Goldberg, L. J. : Intracellular analysis of synaptic mechanisms controlling spontaneous and cortically induced rhythmical jaw movements in the guinea pig. *J. Neurophysiol.* 48 : 126-138, 1982.
- 44) Funk, G. D., Smith, J. C. and Feldman, J. L. : Development of thyrotropin-releasing hormone and norepinephrine potentiation of inspiratory-related hypoglossal motoneuron discharge in neonatal and juvenile mice *in vitro*. *J. Neurophysiol.* 72 : 2538-2541, 1994.
- 45) Di Pasquale, E., Monteau, R. and Hilaire, G. : Involvement of the rostral ventro-lateral medulla in respiratory rhythm genesis during the peri-natal period : an *in vitro* study in newborn and fetal rats. *Dev. Brain Res.* 78 : 243-252, 1994.
- 46) Kutsuwada, T., Sakimura, K., Manabe, T., Takayama, C., Katakura, N., Kushiya, E., Natsume, R., Watanabe, M., Inoue, Y., Yagi, T., Aizawa, S., Arakawa, M., Takahashi, T., Nakamura, Y., Mori, H. and Mishina, M. : Impairment of suckling response, trigeminal neuronal pattern formation, and hippocampal LTD in NMDA receptor $\epsilon 2$ subunit mutant mice. *Neuron* 16 : 333-344, 1996.