

〔原著〕 松本歯学 24 : 191~197, 1998

key words : 摘出脳幹標本—顎舌反射—カエル

カエル水応答の中樞神経機序

2. 摘出脳幹標本における三叉神経および舌下神経の反射性放電

野村浩道, 浅沼直和

松本歯科大学 口腔生理学講座 (主任 野村浩道教授)

松浦幸子

松本歯科大学 口腔解剖学第2講座 (主任 鈴木和夫教授)

Central Mechanisms of Water Response in the Frog
2. Reflex discharges of the trigeminal and hypoglossal
nerves in brain stem preparations in vitro

HIROMICHI NOMURA and NAOKAZU ASANUMA

*Department of Oral Physiology, Matsumoto Dental University School of Dentistry
(Chief: Prof. H. Nomura)*

SACHIKO MATSUURA

*Department of Oral Histology, Matsumoto Dental University School of Dentistry
(Chief: Prof. K. Suzuki)*

Summary

Our previous studies revealed that application of tap water to the oral mucosa of the frog elicits an oral reflex in which rhythmical movements of buccal respiration cease and the buccal pressure rises. To demonstrate the pathway and central mechanism of this reflex, we studied reflex neural discharges of the trigeminal nerve elicited by electrical stimulation of the glossopharyngeal nerve using brain stem preparations in vitro. Removal of the cerebellum did not eliminate the reflex discharge. Dissecting the ipsilateral wall of the medulla oblongata close to the glossopharyngeal nerve terminal eliminated the reflex discharge. The findings indicate that the cerebellum is not related to the reflex, and the proximal, but not the caudal, region of the solitary nucleus is essential for the reflex.

緒 論

カエルの舌背および口腔粘膜には、水受容器とよばれる味覚受容器が存在する^{1,2)}。この受容器の役割を明らかにするため、水受容器が興奮した際に発現する反射について調べたところ、カエルは口腔に流入した淡水を感受して口および鼻孔を閉鎖し、かつ口腔底の挙上ならびに強い嘔みしめによって口腔内圧を上げる反射動作を発現することが分った^{3,4)}。この反射（水受容反射）の経路は、反射の潜時が少なくとも0.2秒もあることから多シナプス反射と推定される⁵⁾。

水受容反射の反射経路を調べるため、先の研究⁶⁾では微小電極を刺入して水応答を生じる中枢神経ニューロンの存在部位を見出すことを試みた。しかし、脳を露出しただけの intact なカエルでは、カエルの動きを完全に押さえることが難しいため、三叉神経運動核周辺のニューロンが反射活動に関与するらしいことは見出したが、十分な知見を得ることができなかった。

カエル味覚反射の中樞経路に関する研究が、石河、花森その他⁷⁻¹²⁾によって行われている。しかし、彼らの研究が水受容反射に関与するかどうかは明らかでない。例えば、Hanamori & Ishiko⁷⁾は舌咽神経を電気刺激すると、中型から大型のウシガエルで後部脳幹（Obex より1-2 mm 吻側，正中線より0.5-1 mm 側方，深さ0.5-1 mm）に電氣的応答が検出されると報告しているが、舌咽神経には水受容器以外の味覚神経線維も、また機械的受容器や痛覚受容器の神経線維も含まれており、どの種類の受容器からの神経線維の応答が明らかでない。また、Hanamori & Ishiko^{8,12)}、Nakachi & Ishiko⁹⁾は、舌に味覚刺激を与えると小脳 Purkinje 細胞で電氣的応答が得られ、また舌咽神経断端に HRP（ワサビ過酸化酵素）を与えると、その一部は transganglionic に小脳に達すると述べているが、その後の研究¹¹⁾によると、応答のあった Purkinje 細胞に HRP を注入するとオリブ核に標識細胞が見出されるとのことであり、小脳が水受容反射に関与しているかどうかは確かではない。そこで、本研究では小脳の切除および後部脳幹の切断によって、水受容反射（舌咽神経-三叉神経反射）が消失するかどうかを調べ、後部脳幹および小脳が水受容反射に

関与するかどうかを検討することとした。

カエル中枢神経系の機能を調べる方法に摘出脳脊髄標本を用いる方法がある¹³⁾。摘出脳脊髄標本を用いると、動きがないので微小電極を用いる実験が容易に行える。また、本研究を行う上でも、脳幹や神経の剖出に時間が掛からず実験がやり易い。そこで、カエルから脳幹を摘出して脳幹標本を作り、まずどの位の時間実験が続けられるかどうかを検討し、次いで、小脳の切除および後部脳幹の切断によって水受容反射（舌咽神経-三叉神経反射）が消失するかどうかを調べることにした。なお、脳幹標本が生存しているかどうかは、舌咽神経-三叉神経反射および舌咽神経-舌下神経反射を指標として調べることにした。

材料と方法

実験に用いたのは、体重80~120 gの小型のウシガエル (*Rana catesbeiana*) である。体重を測定したカエルを氷水に浸して30分ほど放置して動きを押さえた後、MS-222 (200 mg/kg) を腹腔内注射し、カエルを水で覆った状態で視蓋および脊髄上部を含めて脳幹を摘出した。

脳の摘出方法は、先ず頭蓋から胸部にかけて皮膚を大きく切除し、歯科用エンジンをういてダイヤモンドディスクで頭骨背側部に切れ目を入れ、解剖用ハサミにて頭蓋背側部を除去して脳脊髄を露出する。次に三叉、顔面、内耳神経を剖出して出来るだけ神経を長く残して切断する。つぎに脊髄を適当なところで切断し、断端付近をピンセットで保持しながら脊髄神経および舌咽、副、迷走および滑車神経を出来るだけ神経を長く残して切断する。最後に視蓋の吻側で切断して間脳から切り離し、脊髄断端付近を保持して灌流用チャンパーに移動する。なお、脳幹標本が生存し得る摘出時間を検討したところ、脳神経を頭蓋の外まで剖出したのでは時間が掛かり過ぎることが分ったので、脳神経は頭蓋内で切断することとした。また、視蓋や脊髄は脳幹と共に摘出しても脳幹の活動には影響しないように見えたので、脳幹と共に摘出して摘出脳幹標本を保持する部位とした。

灌流用チャンパーは、長さ66 mm、幅10 mm、深さ12 mmの溝を有する台で、溝には底から5 mmのところから40 meshの金網（茶こし）を両端10 mm 空けて張ったものである。

反射性放電の導出は三叉神経および舌下神経(第2脊髄神経)で、神経電気刺激は舌咽神経で、いずれも吸引電極を用いて行った。電気刺激には電気刺激装置(SEN 3301, 日本光電)、反射性放電の導出には2チャンネル生体電気用増幅器(AVB-11)2台を有する万能メモリスコープ(VC-11, 日本光電)を使用した。反射性放電は音声と共にデータレコーダ(SONY, PC 204)に記録した。

灌流溶液には、NaCl 110 mM, KCl 2.5 mM, CaCl₂ 3.5 mM, NaH₂PO₄ 0.1 mM, NaHCO₃ 1.7 mM, ブドウ糖 4 mM, pH 7.9のリンガー溶液を使用した。灌流溶液には100%酸素を常時吹き込

み、灌流速度は毎分5 mlとした。

実験は、室温(24-26°C)で行った。

摘出脳幹は実験終了後ホルマリン固定し、パラフィン切片とし、ヘマトキシリン-エオジン染色した。

結 果

1. 脳幹標本の生存時間

今回の研究には約3カ月飼育していた健康な9匹の小型のウシガエルを使用した。このうち、摘出脳幹が生きていたのは6匹で、手術が成功したにも拘わらず脳幹の活動が見られなかったものが2匹、手術に失敗して死んだものが1匹あった。

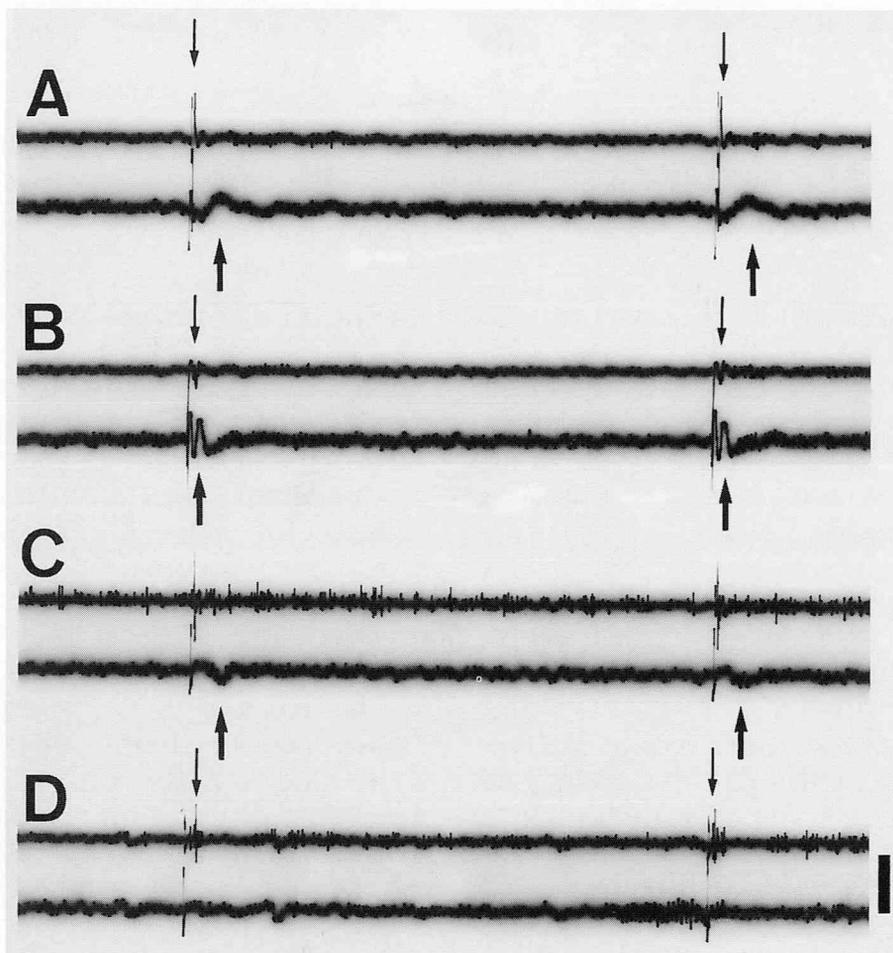


図1：舌咽神経電気刺激による舌下神経および三叉神経の反射性放電：
A～D：異なる4標本の舌下神経(上段)および三叉神経(下段)の反射性放電。
上向きの矢印は三叉神経の反射性放電，下向きの矢印は舌下神経の反射性放電を示す。刺激間隔：1秒間；電位較正：0.5 mV。

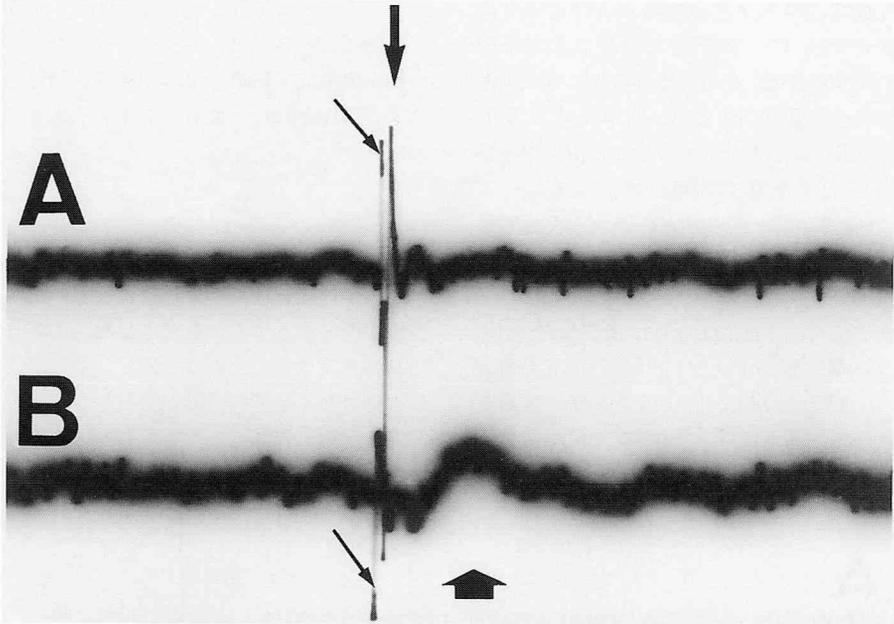


図2：舌咽神経電気刺激による舌下神経（A）および三叉神経（B）の反射性放電：
 図1 Aの左上の部分拡大したもの。上向き矢印は三叉神経の反射性放電，下向き矢印は舌下神経の反射性放電，右下がりの矢印は電気刺激のアーチファクトを示す。

また、摘出脳幹が生きていた6匹のうち、三叉神経と舌下神経の両方に反射性放電が現れたものは4匹で、残りの2匹は三叉神経か舌下神経の一方にしか反射性放電が現れなかった。摘出脳幹が生きていた6匹のうち、2匹は4、5時間以上反射性放電に変化が見られなかったが、他の4匹では反射性放電の大きさが徐々に小さくなって行った。

2. 反射性放電および自発放電

舌咽神経を電気刺激すると、三叉神経および舌下神経に反射性放電が発現する。図1は代表的な4標本の記録を示す。いずれも上段は舌下神経、下段は三叉神経の放電の記録である。図1 AおよびBには三叉神経および舌下神経の反射性放電が見られるが、図1 Cには三叉神経の反射性放電と舌下神経の自発性放電、図1 Dには舌下神経のスパイク状反射性放電および自発性放電と三叉神経の自発性放電が見られる。三叉神経の方は神経が太いためスパイク状の放電は観察されにくく、通常ドーム型の電位変化として観察されたが、舌下神経の方は神経が細いためか、しばしばバースト状の放電が観察された。

図2は、図1 Aの左側の放電を拡大したものである。上段（A）では、電気刺激のアーチファクトに続いて舌咽神経-舌下神経反射の鋭い上向きの放電が見られる。舌咽神経-舌下神経反射では相動性の反射放電が発生することが分かっているので¹⁴⁾、この放電は舌咽神経-舌下神経反射の反射放電とみて間違いない。一方、三叉神経の反射性放電は、図1 A～Cに見られるごとく、時間経過も上下のふれも一定していない。このことは、標本の生理学的状態が均一でないことを意味している。

3. 小脳および脳幹切断

図3は、小脳を切除する前後の三叉神経および舌下神経の反射性放電を示す。切除前後で反射放電の波形が若干変化しているのは、小脳切除の際吸引電極が外れたのを再び装着し直したためである。この実験から、小脳は舌咽神経-三叉神経反射にも舌咽神経-舌下神経反射にも関与していないことが分かる。

図4は、脳幹の切断実験を行った2つの脳幹の切片の写真である。舌咽神経-三叉神経反射は図4 A、Bのいずれの脳幹標本においても最左端

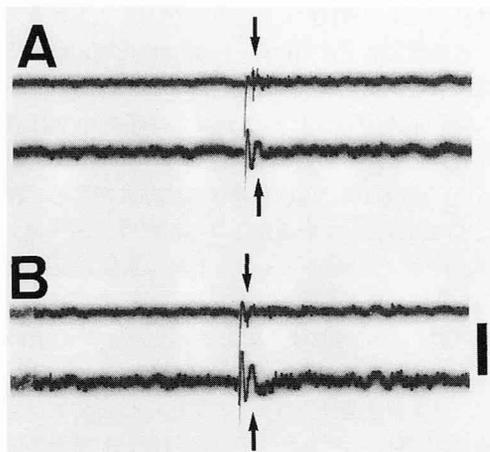


図3：小脳切除前(A)および切除後(B)の舌下神経(上段)および三叉神経(下段)の反射性放電；電位較正：0.5 mV.

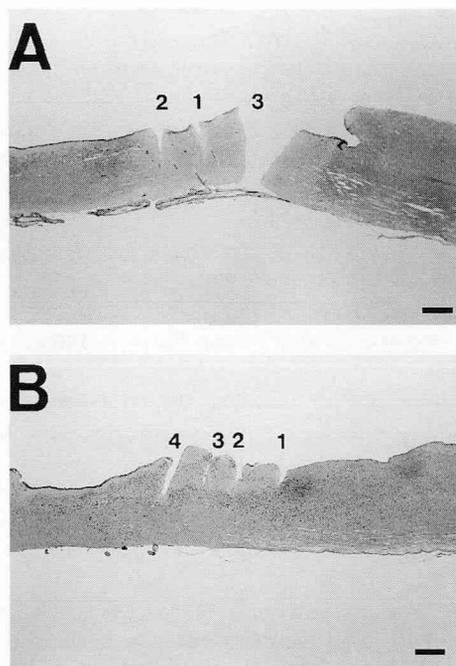


図4：実験に用いた脳幹標本の切片；
切断の切れ込みが最も深い部位を示す。

(舌咽神経起始部のすぐ尾側)での切断で消失したが、他の部位での切断では消失しなかった。一方、舌咽神経-舌下神経反射は図4 Aの最右端の切断のみで消失し、他の部位での切断では消失しなかった。

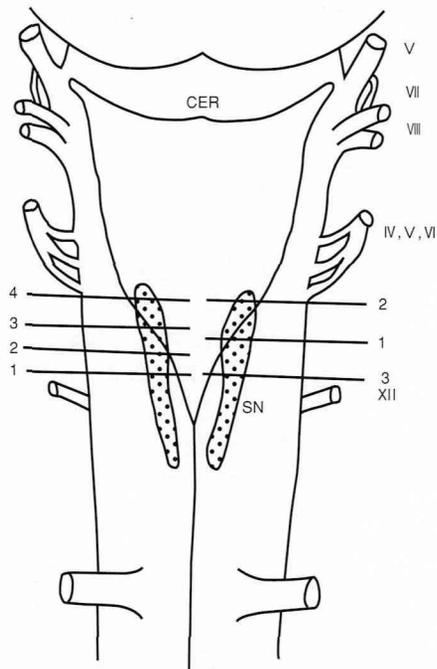


図5：脳幹の模式図と切断部位：
CER：小脳；SN：孤束核；V～XII：
脳神経；1～3または4：切断部位

図5はカエル脳幹を背側より見た模式図で、右は標本A、左は標本Bにおける脳幹切断部位(図中の横線)を示す。標本Aの切断部位3は脳幹全体を切断したが、それ以外は刺激および記録電極と同側の脳幹側壁を上部から切断した。

考 察

今回の研究では、摘出脳幹が生きていたのは6匹で、手術が成功したにも拘わらず脳幹の活動が見られなかったものが2匹あった。また、摘出脳幹が生きていた6匹のうち、三叉神経と舌下神経の両方に反射性放電が現れたものは4匹で、残りの2匹は三叉神経か舌下神経の一方にしか反射性放電が現れなかった。このことは、本研究の脳幹摘出方法あるいは灌流方法がまだ適切でないことを意味する。しかし、McLean et al.¹³⁾も実験に使用出来たのは約半数であったと述べているので、カエルの健康状態なども脳幹摘出の成功不成功に関係するのかも知れない。

Hanamori & Ishiko⁸⁾は、舌咽神経断端に与えたワサビ過酸化酵素(HRP)がtransganglionicに

小脳に至ることを示している。また、Hanamori et al.^{10,12)}は、舌咽神経の電気刺激および食塩とキニーネの味覚刺激によって小脳で電氣的応答が記録されることも示している。しかし、本研究では、小脳を切除しても水受容反射（舌咽神経-三叉神経反射）は消失しなかったため、彼らの見出した食塩とキニーネの味覚刺激によって生じる小脳の応答は、水受容反射（舌咽神経-三叉神経反射）とは関係のない応答と考えられる。なお、彼らの研究によると、舌咽神経の電気刺激によって電氣的応答が生じる小脳の応答部位にHRPを注入すると、延髄オリブ核ニューロンまで逆行輸送される¹¹⁾ので、この経路はオリブ核を経由する反射または感覚応答で、舌折り畳み反射である舌咽神経-舌下神経反射¹⁵⁾とも異なる現象であると考えられる。なお、Nakachi & Ishiko⁹⁾は、舌咽神経-舌下神経反射経路を電気生理学的に調べ、舌咽神経味覚刺激に応答するニューロンは延髄孤束核に、舌下神経電気刺激に応答するニューロンは舌下神経運動核に存在することを示している。一方、Matsushima et al.¹⁶⁾は、コバルトレジンおよびHRPの逆行性軸索輸送を行い、舌咽神経線維が舌下神経運動ニューロンに直接終止することを示している。従って、この舌折り畳み反射である舌咽神経-舌下神経反射は反射の中で最も単純な単シナプス反射と考えられる。

Matesz & Szekely¹⁷⁾は、孤束核は舌咽神経運動核吻側付近に始まり、obex付近より多数の神経線維を腹側に送って細くなる一方、孤束核の吻側部からは少数の細い神経線維を三叉神経脊髄路核へ向かって送ると述べている。本研究では、舌咽神経より吻側の脳幹切断は舌咽神経-三叉神経反射を当然消失させると考えたので行わなかった。そこで、前者の経路が舌咽神経-三叉神経反射に関与しているかどうかは不明である。

前研究で水受容反射に関与する脳幹ニューロンの応答が導出出来たのは、三叉神経運動核周辺および顔面神経核の吻側部だけであり、後部脳幹からは応答が記録出来なかった。また本研究における延髄側壁切断実験から、舌咽神経基部からobexまでの後部3/4の延髄側壁は、水受容反射（舌咽神経-三叉神経反射）には関係しないことが分かった。従って、上述のobex付近より多数の神経線維を腹側に送る経路は水受容反射（舌咽

神経-三叉神経反射）とは無関係と考えられる。

水受容反射（舌咽神経-三叉神経反射）は、味覚反射であると同時に呼吸反射でもある⁴⁾。Itoh & Watanabe¹⁸⁾は、ヒキガエルでは呼吸中枢は脳幹全体に広がっているが、口呼吸ニューロンは顔面神経核の腹側と前庭神経核内腹側に密集して存在すると報告している。これら口呼吸ニューロンは、前報⁹⁾の結果からみて、カエル水受容反射に関与している可能性が高い。従って、カエル水受容反射の中樞経路は、孤束核ニューロンの次のニューロンを孤束核の近傍の延髄網様体を持つ一方、三叉神経運動核ニューロンの一つ前のプレ運動ニューロンは、顔面神経核の腹側と前庭神経核内腹側に分布する口呼吸運動のプレ運動ニューロンそのものかも知れない。

文 献

- 1) Zotterman Y (1949) The response of the frog's taste fibers to the application of pure water. *Acta Physiol Scand* **18**: 181-9.
- 2) Nomura H and Sakada S (1965) On the "water response" of frog's tongue. *Jpn J Physiol* **15**: 433-43.
- 3) Nomura H and Kumai T (1981) Reflex discharge evoked by water stimulation on the frog tongue. *Brain Res* **221**: 198-201.
- 4) Nomura H and Suzuki H (1995) Role of water receptor in the frog. *J Comp Physiol A* **176**: 11-5.
- 5) Nomura H and Suzuki H (1987) Latencies of reflex discharges in some oro-facial reflexes of the frog. *Matsumoto Shigaku* **13**: 218-21.
- 6) 野村浩道, 鈴木宏和 (1997) カエル水応答の中樞神経機序 1. 口蓋粘膜水刺激および舌咽神経刺激に対する脳幹ニューロンの応答. *松本歯学* **23**: 106-12.
- 7) Hanamori T and Ishiko N (1983) Surface and intramedullary potentials evoked by stimulation of the glossopharyngeal nerve in frogs. *Brain Res* **260**: 51-60.
- 8) Hanamori T and Ishiko N (1983) Intraganglionic distribution of the primary afferent neurons in the frog glossopharyngeal nerve and its transganglionic projection to the rhombencephalon studied by HRP method. *Brain Res* **260**: 191-9.
- 9) Nakachi T and Ishiko N (1986) Gustatory signal processing in the glossopharyngeal-hypoglossal

- reflex arc of the frog. *Jpn J Physiol* **36** : 189—208.
- 10) Hanamori T, Nakashima M and Ishiko N (1986) Responses of cerebellar cortex to electrical stimulation of the glossopharyngeal nerve in the frog. *Neurosci Lett* **68** : 345—50.
 - 11) Hanamori T, Nakashima M and Ishiko N (1987) Origin of the climbing fibers activated by glossopharyngeal nerve stimulation in the frog. *Neurosci Lett* **75** : 11—6.
 - 12) Hanamori T and Ishiko N (1987) Taste responses of Purkinje cells in the frog cerebellum. *Neurosci Lett* **76** : 285—90.
 - 13) McLean HA, Perry SF and Remmers JE (1995) Two regions in the isolated brainstem of the frog that modulate respiratory-related activity. *J Comp Physiol A* **177** : 135—44.
 - 14) Nomura H and Kumai K (1982) A specific chemoreceptor to linguo-hypoglossal chemoreflex of the frog. *Jpn J Physiol* **32** : 683—7.
 - 15) 野村浩道, 鈴木宏和 (1985) カエル味覚性舌反射に及ぼすアルコール, アミノ酸および苦味物質の刺激効果. *松本歯学* **11** : 18—21.
 - 16) Matsushima T, Satou M and Ueda K (1987) Direct contact between glossopharyngeal afferent terminals and hypoglossal motoneurons revealed by double labeling with cobalt-lysine and horseradish peroxidase in Japanese toad. *Neurosci Lett* **80** : 241—5.
 - 17) Matesz C and Szekely G (1978) The motor column and sensory projections of the brachial cranial nerves in the frog. *J Comp Neurology* **178** : 157—76.
 - 18) Itoh F and Watanabe S (1962) Localization and organization of respiratory neurons in the brainstem of the toad, with reference to activities of slow motor system. *Jpn J Physiol* **12** : 611—22.