

〔原著〕 松本歯学 23 : 106~112, 1997

key words : 脳幹ニューロン - 水応答 - カエル

## カエル水応答の中樞神経機序

### 1. 口蓋粘膜水刺激および三叉, 顔面および舌咽神経刺激に対する脳幹ニューロンの応答

野村浩道, 鈴木宏和

松本歯科大学 歯学部 口腔生理学講座 (主任 野村浩道 教授)

## Central Mechanisms of Water Response in the Frog

### 1. Responses of brain stem neurons to water and electrical stimulation

HIROMICHI NOMURA and HIROKAZU SUZUKI

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

#### Summary

Our previous studies revealed that application of tap water to the oral mucosa in the frog elicits the oral reflex in which rhythmical movements of buccal respiration are depressed and the buccal pressure is elevated. In order to examine the pathway and central mechanism of this reflex, we studied the neural discharges in the brain stem elicited by water stimulation of the palatal mucosa and by simultaneously applied electrical stimulation of the glossopharyngeal, facial and trigeminal nerves. Among 33 neurons whose activity was recorded from the ventral side of the brain stem, three were motoneurons and nine were presumed to be premotoneurons, but 20 were of unidentified types. The interneurons with recorded activity were located lateral to the trigeminal motor nucleus and medial to the facial nucleus. No interneuron activity was observed in the caudal part of the brain stem.

#### 緒 論

カエルの舌背および口蓋粘膜には, 水受容器とよばれる味覚受容器が存在する<sup>1,2)</sup>. この受容器の役割を明らかにするため, 水受容器を興奮させた際に発現する反射について研究したところ, 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噛みしめによって口腔内圧を上げる反射動作の発現することが分った<sup>3,4)</sup>. この反射の経路は, 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<sup>5)</sup>.

反射経路を見出すもっとも基本的方法は, 水応答を生じる中枢神経ニューロンの存在部位を見出

し、解剖学的研究で作成された脳地図を参照して同定することであると考えられる。そこで、ガラス微小電極およびタングステン微小電極を用いて、まず水応答を生じる脳幹ニューロンの存在部位を調べることにした。

カエルの脳の電気生理学的研究は少なくないが、ほとんどが脳の背側から電極を刺入している。しかし、われわれの研究では三叉神経運動核周辺のニューロン活動を調べる必要があると思われるが、背側からでは小脳が邪魔して具合が悪いと考え、腹側から電極を刺入する方法を試みることにした。この方法は、従来の研究では行われたことがない初めての方法であるので、本研究では、この方法の可否を検討することを主目的として研究を行った。

### 材料と方法

実験に用いたのは、12匹のトノサマカエル (*Rana nigromaculata*) である。MS-222で麻酔したのち、坐骨神経および上腕神経を切断して四肢を不動化し、舌咽神経舌枝、三叉神経下顎枝および顔面神経下顎枝を出来るだけ長く残して剖出した。次いで、舌動脈および外側および内側下顎動脈を結紮し、下顎を切除した。手術したカエルは、木製の台に背位に固定し、上顎粘膜に掛けた溶液が流れ落ちるようにした。なお、頭蓋が動かないよう上顎は針で固定した。次に上顎粘膜尾側部を剝離し、脳幹下面(腹側)の頭蓋骨および脳硬膜を切除して脳幹を露出した。脳軟膜は電極を刺入する部位のみ電極刺入直前に除去した。下垂体は除去した。

記録電極には、4M NaClを入れたガラス微小電極あるいは微小タングステン電極(FHC製)を使用した。脳幹ニューロンの活動電位は、高インピーダンス入力前置増幅器および陰極線オシロスコープを介してテープレコーダーに記録し、必要に応じて写真撮影を行った。神経電気刺激には3本の白金線双極電極を使用し、舌咽神経舌枝、三叉神経下顎枝および顔面神経下顎枝を同時刺激した。舌咽神経および顔面神経の電気刺激は順行性スパイクの発火を生じさせるものであるが、三叉神経下顎枝の電気刺激は、運動ニューロンを識別するためのものである。

刺激溶液には、水道水あるいは0.5 mM CaCl<sub>2</sub>

を使用した。刺激溶液は、スポイトを用いて3~4 mlを約10秒かけて口蓋粘膜全面に掛けた。刺激と刺激の間は、リンガー溶液で2分以上順応させた。

実験は、室温(20~25℃)で行った。

なお、カエル脳幹神経核の部位は、文献6)によった。

### 結 果

#### 1. 運動ニューロン

記録されるニューロン活動が運動ニューロンのものであるかどうかは、運動神経の電気刺激によって短潜時の逆方向性スパイクが発火することと記録部位で判別することができる。図1および図2は、その典型的な例を示す。図1Aは、口蓋粘膜の水刺激によって発火した放電であり、同図Bは三叉・顔面・舌咽神経同時電気刺激によって発火したものである。図1Aの場合の潜時は、水刺激を行った時点が正確には分らないが、図1Bの場合には、電気刺激のアーチファクトが記録に入るため刺激時点が正確に分る。この記録では、電気刺激のアーチファクトと逆方向性スパイクが重なって一つに見えるので、潜時が極めて短いことがわかる。

図2は、電気刺激のアーチファクトと逆方向性スパイクとが分離して見られるように陰極線オシロスコープの掃引を速くして記録したものである。およそ3ミリ秒の潜時で発火していることが分る。逆方向性スパイクは単発で、バーストとして発火するものはなかった。一方、30ミリ秒以上の潜時で発火している5個のスパイクは後述する順方向性スパイクである。幾つものニューロンを経由しているので潜時は長い。この図では単発であるが、順方向性発火の場合、バーストとして発火するものが多かった。図1および図2の記録は、いずれも吻側の横行動脈より前方、深さ1 mmの部位で記録されたものである。従って、電極の刺入部位から判断して三叉神経運動核の運動ニューロンのものである。このような運動ニューロンからの記録は記録した28個のニューロン中3個のニューロンで観察された。

#### 2. その他のニューロン

(1) 神経電気刺激で短潜時で発火するニューロン  
運動ニューロンと同じく短潜時で発火するが、

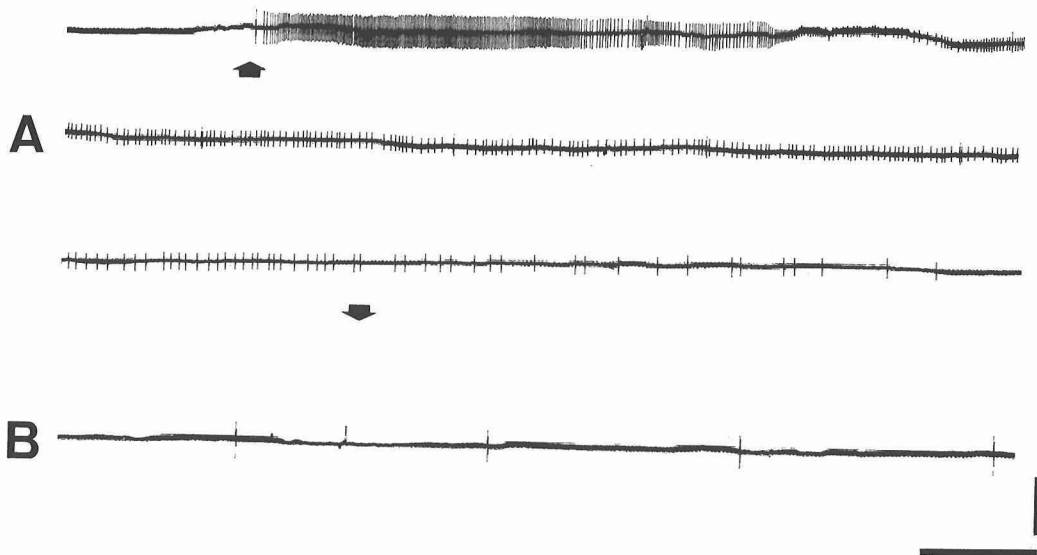


図1：三叉神経運動核の運動ニューロンの応答：

A：口蓋粘膜水刺激による順方向性応答；B：三叉神経電気刺激による逆方向性応答（顔面・舌咽神経刺激による順行性応答は発現していない）。Aの上向きと下向きの矢印は、それぞれ口蓋に水およびリンガー溶液を流した時点を示す。較正は、0.5 mV および1秒を示す。

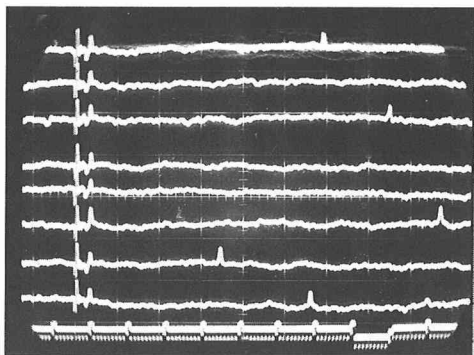


図2：三叉神経運動核の運動ニューロンの応答：

三叉神経電気刺激による逆方向性応答と顔面・舌咽神経電気刺激による順方向性応答が見られる。較正は、1 mV および10 ms と 1 ms を示す。

記録部位が三叉神経運動核より内側で正中に近い部位で記録されたニューロンが4個あった。これらニューロンは三叉神経中脳路核ニューロンか、感覚入力をシナプス1個を介して受ける内側網様体ニューロンであるかも知れない。

(2) 神経電気刺激で発火せず、かつ水刺激で発火するニューロン

神経電気刺激で逆方向性スパイクが発火せず、かつ口蓋粘膜水刺激で順方向性スパイクを発火するニューロンは観察できなかった。

(3) 神経電気刺激で長潜時で発火するニューロン  
神経電気刺激で長い潜時をもつ順方向性スパイクを発火するニューロンは9個観察された。これら9個のニューロンのうち7個は、三叉神経運動核および顔面神経核の外側に存在し、2個は顔面神経核の内側に存在していた。これらのニューロンは、われわれが対照としてしている反射経路にある介在ニューロンの可能性が高い。しかし、これらのニューロンの一部は、頤下筋および下顎下筋以外の筋肉（大咬筋深層、小咬筋および翼突筋）の

運動ニューロンである可能性もある。

これらニューロンのデータを図3および図4に示す。図3のニューロンは、第6脳神経より1 mmほど吻外側で、深さ1 mmの部位にあった。この部位は顔面神経核のある部位に近く、顔面神経核ニューロンの可能性も否定出来ない。図3では、最上段左より最下段右に向かって刺激強度を上げている。刺激強度の低いところでは潜時が長いので、この記録には逆方向性スパイクは含まれていないと思われる。しかし、2段目以下の発火の潜時はかなり短く10ミリ秒以下である。舌咽神経の水線維を電気刺激し、三叉神経で記録したときの順行性放電の潜時は少なくとも10ミリ秒はあるので、この記録のニューロンは三叉神経下顎枝または顔面神経下顎枝を求心路とする三叉神経感覚核の可能性が高い。

この記録の発火のスパイクの高さは大きくばらついている。しかし、周期的に滑らかに変動しているので単一ニューロンの発火と思われる。このスパイクの高さの変動の原因は不明である。

図4の記録は、顔面神経核の内側で、深さ1 mmの部位で記録されたものである。この記録では、放電の潜時が極めて長く、最下段の記録で65ミリ秒もある。多シナプス反射の発火と思われる。顔面神経支配の筋肉に下顎下制筋があるが、下顎下制筋にはこのような長潜時の反射は起こらないので、この発火はわれわれが対照としている反射の経路に存在する介在ニューロンのものと考えられる。

図5は、三叉神経運動核より1 mm吻側で得られた記録である。刺激なしでは発火しない(最上段)が、刺激を与えると低頻度で発火を始めていく(2段目以降)。しかし刺激とは同期していない。刺激を止めれば、しばらく発射が続いた後発火が停止する(最下段)。このニューロンの正体は不明であるが、脳幹網様体賦活系に属するニューロンかも知れない。

#### (4) 電気刺激で発火しないニューロン

神経電気刺激で順方向性スパイクや逆方向性スパイクが発火せず、かつ口蓋粘膜水刺激でも発火しないが、自発発火しているニューロンは16個あった。これらニューロンがどのような種類のニューロンであるかは不明である。これらのニューロンのうち、9個は運動核の内側にあった

が、7個は外側にあった。

## 考 察

### 1. 実験方法について

#### (1) 脳の露出方法

本研究では、手術を脳の腹側から行い、脳の腹側を露出した。下垂体を除去すると、三叉神経運動核より吻側部に電極を刺入することが出来る。背側からでは、小脳が邪魔をして、三叉神経運動核より吻側部を調べるのが困難であるので、この点は脳の背側から調べる方法より優れている。しかし、尾側部では咽頭粘膜および内臓が邪魔をして孤束核などを調べるのが困難であった。また、三叉神経運動核や顔面神経核は、腹側表面から比較的浅いところにあるので調べ易いが、孤束核などは背側表面からの方が調べやすいように思われる。

脳幹部の脳は腹側表面の凹凸がない。そのため、刺入する電極の位置や深さを決めるのが容易である。とくに、三叉・顔面神経、内耳神経、舌咽・迷走神経に沿って動脈が脳の軸と直角に入ってくる動脈は、よい目印となって都合が良かった。

#### (2) 動物の固定方法

カエルを背位に固定すると、頭蓋をピンなどで動かないようにしっかり固定することが出来る。この方法によって、カエルの小さな動きはほぼ完全に止めることが出来た。しかし、ときどき生じる激しい動作では、完全に動きを止めることが出来ず、電極が抜ける例が多かった。動物の固定方法について工夫が必要と思われた。

#### (3) 記録電極の選定

本研究では、4モル食塩ガラス微小電極およびタンダステン微小電極を用いた。いずれも細胞外電位のみしか誘導できず、細胞内電位はごく短時間のみしか誘導出来なかった。本研究の目的は、孤束核と三叉神経運動核との間にある介在ニューロンの検出とそれらニューロンの役割を解明することにあるが、肝心な介在ニューロンは多数存在すると推察されるにも拘らずほとんど見出せなかった。これは、介在ニューロンが小さく、本研究で使用した電極では導出出来なかったのかも知れない。電極についても工夫が必要のように思われた。

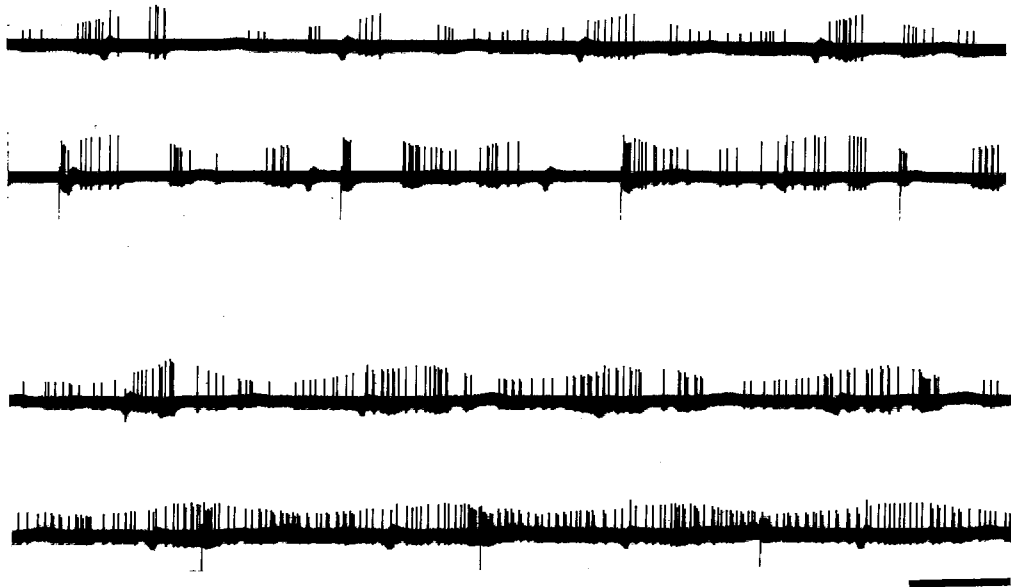


図3：三叉・顔面・舌咽神経同時電気刺激による脳幹ニューロンの応答：  
記録部位：顔面神経核かその外側部。潜時が短いことに注目。較正は、0.5 mV および 1 秒を示す。

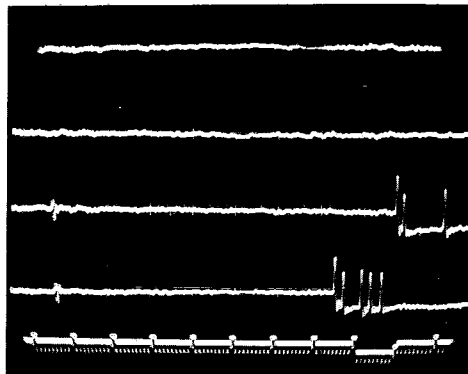


図4：三叉・顔面・舌咽神経同時電気刺激による脳幹ニューロンの応答：  
記録部位：顔面神経核かその内側部。潜時が長いことに注目。較正は、1 mV および 10 ms と 1 ms を示す。

#### (4) 刺激電極の位置

本研究では、三叉神経は下顎枝のところで電気刺激したが、逆方向性スパイクによって三叉神経運動核ニューロンを同定するには不適切であった。もっと脳に近い、すべての咀嚼筋を支配する部位で電気刺激すべきと考えられる。

顔面神経下顎枝および舌咽神経舌枝は感覚枝であり、水受容器からの求心神経線維（水線維）を含んでいる。顔面神経筋枝および舌咽神経咽頭枝は下顎下制筋や咽頭筋を支配しているが、本研究

ではこれらの神経は電気刺激していないので、顔面神経核運動ニューロンの同定はやっていないことになる。本研究で疑核運動ニューロンの応答が導出できなかったのはこのためである。

#### 2. 実験結果について

本研究で応答が導出出来たのは、三叉神経運動核および顔面神経核のある吻側部だけであり、尾側部からは応答が記録出来なかった。本研究で対象としている反射は潜時が長く、不規則なことから脳幹網様体が介在しているのではないかと推定

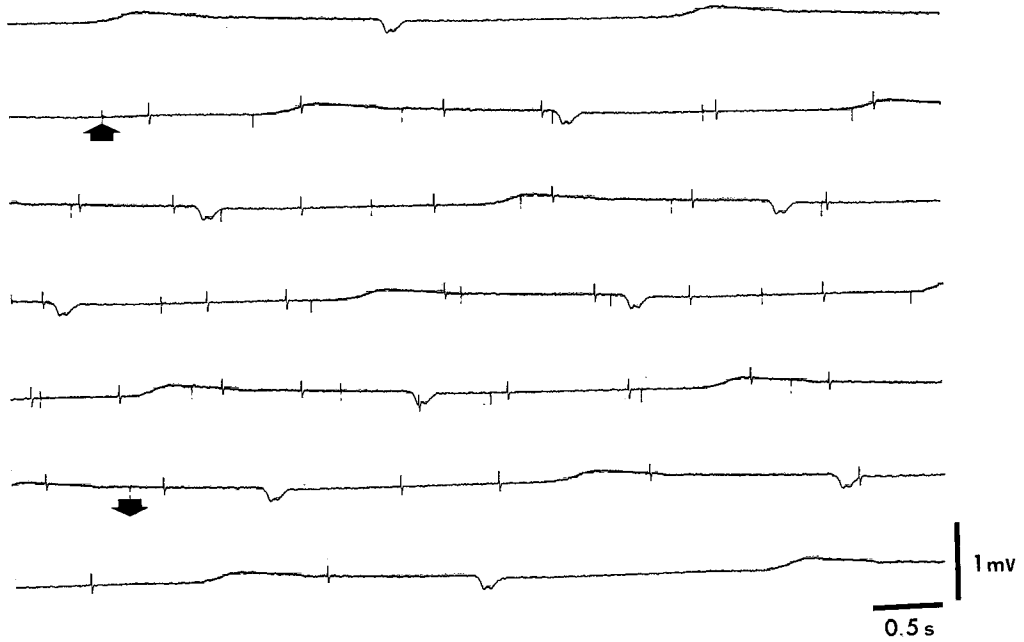


図5：三叉・顔面・舌咽神経同時電気刺激による脳幹ニューロンの応答：  
 記録部位：三叉神経運動核より1 mm 吻側の部位。応答が刺激と対応していないことに注目。上向きと下  
 向きの矢印は、電気刺激を開始した時点および停止した時点を示す。

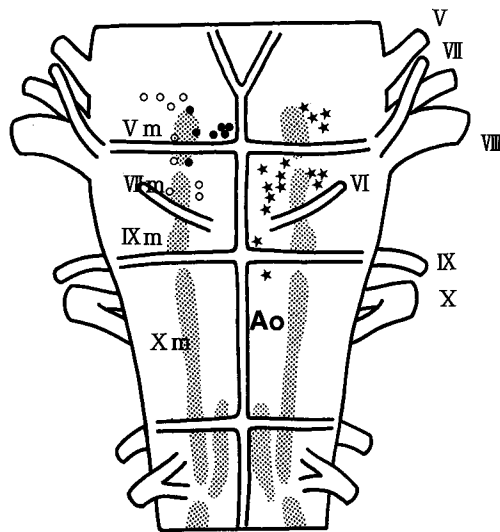


図6：記録電極の位置：  
 ●は三叉神経運動核および中脳路核ニューロン，○は三叉・顔面・舌咽神経同時電気刺激に対して長潜時で  
 応答するニューロン，★は刺激に対して応答しない自発発火しているニューロン，V，VI…は脳神経，Vm，  
 VI m…は運動核，Aoは脳底動脈を示す。

しているが、それらしきニューロンは3~4個に過ぎず、反射経路の解明にはほど遠い結果となった。

脳幹網様体を經由する歩行反射では、脳幹網様体で入力ニューロン、介在ニューロンおよび出力ニューロンの3個のニューロンを經由することが知られている<sup>7)</sup>。また、大脳皮質咀嚼運動野刺激で発現するリズムカルな咀嚼運動でも、3個の脳幹網様体ニューロンを經由することが分っている<sup>8)</sup>。従って、本研究で見い出された数10ミリ秒以上もある潜時の応答は、脳幹網様体を經由している可能性が高い。大脳皮質咀嚼運動野の電気刺激で発現するリズムカルな咀嚼運動では、プレ運動ニューロンの存在部位として、三叉神経運動核を取り囲む脳幹網様体と内側網様体の2つの部位が示唆されている<sup>9)</sup>。図4にみられるごとく、本研究では数10ミリ秒以上もある潜時の応答が見られているが、これらは三叉神経運動核を取り囲む脳幹網様体ニューロンかも知れない。

本研究において網様体介在ニューロンらしきニューロンの応答が少数しか記録出来なかった理由に、網様体ニューロンの大きさが考えられる。Herrick<sup>10)</sup>は、網様体介在ニューロンの存在部位として、脳幹感覚野と脳幹運動野の間にある周脳水道灰白質(periventricular grey)を挙げているが、この部位のニューロンは小型である。“記録電極の選定”で前述したごとく、われわれが使用した電極では導出出来なかったのかも知れない。一方、介在ニューロンらしきニューロンの応答が少数記録出来たのは、われわれが対象とする反射に巨大網様体ニューロンが関与しているためかも知れない。大脳皮質咀嚼運動野電気刺激で発現するリズムカルな咀嚼運動の下降路には、巨大網様体ニューロンが含まれていることが分っているからである<sup>8)</sup>。

網様体入力ニューロンの存在部位としては、孤東核またはその近傍が考えられる。Itoh & Watanabe<sup>11)</sup>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。一方、Kogo et al.<sup>12)</sup>は、カエル呼吸中枢は脳幹尾側(Obexの近傍)に存在すると述べている。前者は口呼吸プレ運動ニューロンスなわち網様体の出力ニューロン、後者は孤東

核またはその近傍の網様体入力ニューロンの存在部位と考えると説明がつく。そこで、われわれが対象としている反射は口呼吸と密接な関係を持っている<sup>2)</sup>ので、網様体入力ニューロンの存在部位は孤東核またはその近傍、網様体出力ニューロンは口呼吸プレ運動ニューロンであるかも知れない。

## 文 献

- 1) Zotterman, Y. (1949) The response of the frog's taste fibers to the application of pure water. *Acta Physiol. Scand.* 18: 181-189.
- 2) Nomura, H. and Sakada, S. (1965) On the "water response" of frog's tongue. *Jpn. J. Physiol.* 15: 433-443.
- 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: 11-15.
- 5) Nomura, H. and Suzuki, H. (1987) Latencies of reflex discharges in some oro-facial reflexes of the frog. *Matsumoto Shigaku*, 13: 218-221.
- 6) Opdam, P., Kemali, M. and Nieuwenhuys, R. (1976) Topological analysis of the brain stem of the frogs *Rana esculenta* and *Rana catesbeiana*. *J. Comp. Neurol.* 165: 307-332.
- 7) Shimamura, M., Kogure, I. and Wada, S. (1980) Three types of reticular neurons involved in the spino-bulbo-spinal reflex of cats. *Brain Res.* 186: 99-113.
- 8) 入来篤史, 野崎修一, 中村嘉男 (1988) 吸嚥から咀嚼への転換に関する中枢神経の再構築, 咀嚼システムの形成と適応, 53-65. 風人社, 東京.
- 9) Nieuwenhuys, R. and Opdam, P. (1976) Structure of the brain stem, In *Frog Neurobiology* (ed. Llinas, R. and Precht, W.), 811-855. Spring-Verlag, New York.
- 10) Herrick, C. J. (1930) The medulla oblongata of *Necturus*. *J. Comp. Neurol.* 50: 1-90.
- 11) Itoh, F. and Watanabe, S. (1962) Localization and organization of respiratory neurons in the brain-stem of the toad, with reference to activities of slow motor system. *Jpn. J. Physiol.* 12: 611-622.
- 12) Kogo, N., Pery, S. F. and Remmers, J. E. (1994) Neural organization of the ventilatory activity of the frog. *I. J. Neurobiol.* 25: 1067-1079.