

ラット三叉神経運動核におけるニューロン-グリア細胞構築と
三叉神経運動核に投射する抑制性ニューロンに関する研究

赤 城 忠 臣 河 田 亮 高 橋 理

神奈川歯科大学人体構造学講座組織学分野

(受付：2013年3月8日)

Study of neurons and glial cells in the trigeminal motor nucleus and inhibitory neurons
projecting to the trigeminal motor nucleus

Tadaomi AKAGI, Akira KAWATA and Osamu TAKAHASHI

Division of Histology, Embryology and Neuroanatomy, Department of Anatomy, Kanagawa Dental College
82 Inaoka-cho, Yokosuka, Kanagawa, 238-8580, Japan

Abstract

Recent advances in the understanding of glia-neuron networks have revealed that, glial cells in the hippocampus and cerebellum respond differently within the neural network. However, detailed studies of the distribution and role of glial cells in parts of the brain stem such as the pons-medulla are still undertaken. First of all the aim of this study was to investigate the distribution of glial cells in the trigeminal motor nucleus (TMN) innervating the masseter muscle. We observed S100-like immunoreactivity in many regions of the brain stem, including the TMN. Furthermore, we found that many S100-like immunoreactive cells were distributed in the ventromedial subnucleus of the TMN, which innervates the jaw-opening muscles. Recent reports have shown that the S100 protein functioned as a neurotransmitter in neurons from the astrocytes, and regulated neural activity in the brain. Thus, these results suggest the possibility that S100-positive cells in the TMN may participate in the formation of neural circuit involved in masticatory movements, especially in jaw opening. Secondary the aim of this study was to detect, the TMN and its surrounding regions containing commissural GABAergic and glycinergic neurons that project axons to the contralateral TMN. In the present study, we used digoxigenin-labeled probes to detect glutamic acid decarboxylase 67 (*GAD-67*) and glycine transporter 2 (*GLYT-2*) mRNAs by *in situ* hybridization. We observed expressions of *GAD-67* and *GLYT-2* mRNAs in the region around the TMN (especially the supratrigeminal nucleus). Some neurons expressed either *GAD-67* mRNA or *GLYT-2* mRNA, and some neurons expressed both the mRNAs. Previous studies have shown that *GAD-67* and *GLYT-2* are often co-localized in trigeminal premotor neurons. Our observation that some neurons in the supratrigeminal nucleus co-express *GAD-67* and *GLYT-2* mRNAs is consistent with these previous findings.

緒 言

ヒト中枢神経系においてニューロン以上の数的支配を示すグリア細胞と脳機能との関連はいまだその全貌が明らかではない。従来、グリア細胞は血液脳関門の

形成、髄鞘の形成、神経栄養因子の放出および貪食作用などいわゆるニューロン機能を支持すると考えられたが、近年になり神経回路網におけるシナプス伝達そのものを制御し得る事実が示されてきた¹⁻³⁾。グリア細胞は星状膠細胞、稀突起膠細胞および小膠細胞の3種

より構成されるが、特に数的に優位を示す星状膠細胞はニューロンの細胞体および軸索終末に接触しシナプスを包囲するのみならず、種々の神経伝達物質に対して即時的に応答し、グルタミン酸、アデノシン三リン酸 (ATP) など細胞間メッセンジャーを放出する。すなわちニューロンとグリア細胞の間に存在する機能連関が中枢神経系の機能、発生、発育の解析に重要であることが強く示唆される^{4,5)}。しかし、中枢神経系でも橋・延髄などの脳幹領域におけるグリア細胞の分布や役割についての詳細な研究は行われていない。

また、顎運動は三叉神経運動核 (Vm) の運動ニューロンが末梢性および中枢性の入力を受けることによって遂行されている。これらの入力のほとんどは運動前ニューロンと呼ばれるニューロンを介して三叉神経運動核に伝達されている。これらは脳の中でも下位脳幹である橋や延髄に多数認められる。とくに、三叉神経感覚核群 (三叉神経中脳路核 (Vmes), 三叉神経主感覚核 (Vp), 三叉神経脊髄路核 (Vsp)) や網様体外側部に属する Vm 周囲の網様体および橋・延髄の小細胞性網様体にそのほとんどが存在する⁶⁾。Vm 周囲の網様体は延髄の小細胞性網様体の一部であって、とくに Vm の背側から吻背側方にかけての領域は三叉神経上領域 (sV) と呼ばれ、この領域には抑制性のニューロンが存在している⁷⁻¹³⁾。これらの運動前ニューロンは Vmes のニューロン (同側性に分布) を除き、一般には同側性有意な両側性に分布を示し、顎反射を初めとする脳幹反射において介在ニューロンとして働いており、上位の運動中枢からの投射を受け、その情報を Vm のニューロンに伝達することによって、顎運動の発現や調節に重要な役割を担うことが知られている^{7,14-17)}。

しかし、Vm とその運動前ニューロンとの神経線維連絡が個体発生、発達のどの時期に完成しているのか、その形成機序にどのような因子が関わっているか等はいまだ解明されていない。そして、このような顎運動を形成する神経回路の形成機序を解明することは、オーラルディスクネジア等の現在では治療困難な口腔機能異常の発現原因の解明、治療方法の確立に繋がる。

本研究ではまず、顎運動に関係する運動前ニューロンと Vm ニューロンとの線維連絡においても、グリア細胞が関与していると考え、顎運動の神経回路網を形成する主な構成要素である咀嚼筋を支配する閉口筋運動ニューロンや開口筋運動ニューロンとグリア細胞の関係について、グリア細胞のマーカーとしてグリア線維性酸性タンパク質 / glial fibrillary acidic protein (GFAP) と S100 タンパク質を指標に、ニューロン-グリア回路網の観点よりその構造を観察した。

また、近年抑制性神経伝達物質である γ アミノ絡酸 (GABA) とグリシンを共発現するニューロンが報告がされている^{18,19)}。そこで Vm に抑制性の情報を伝達することが知られている sV に存在するニューロンにおいて⁷⁻¹³⁾、GABA 作動性ニューロンのマーカーであるグルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD-67) とグリシン作動性ニューロンマーカーであるグリシン輸送体 (GLYT-2) の遺伝子発現について *in situ* hybridization 法を用いて観察した。

実験材料および方法

1. 実験動物

実験動物には体重 200~250 g, 雄性, Wistar 系ラット (日本クレア, 東京) を 88 頭用いた。明暗周期 12 時間, 室温 20°C で, 飲水, 摂食は自由に与えて飼育した。本実験は, 神奈川歯科大学動物倫理委員会の承認を受け, 定める動物実験指針を遵守して行われた。実験動物は「動物実験の飼育および保管等に関する基準」(昭和 55 年 3 月 27 日総理府広告 6 号) に基づいて, 倫理的に扱った。実験動物はバルビタール酸ナトリウム (50 mg/kg) を腹腔内注射することにより深麻酔し開胸, 左心室より 4% paraformaldehyde を含む 0.1 M リン酸緩衝液 (PBS) (pH 7.4) にて灌流固定した後に, 三叉神経運動核領域を含む脳幹部を摘出し, 同固定液にて一晚 (4°C, 12 時間) 後固定を行った。

2. Nissl 染色および Neuro Trace green による蛍光 Nissl 染色

実験動物 12 頭において後固定を終えた脳幹部を 25% のシュウクロースを含む 0.1 M PBS (pH 7.4) に浸漬後, Tissue-Tek O.C.T. Compound (サクラファインテック, 東京) にて包埋した。脳幹の凍結冠状断連続切片はクリオスタットを用いて厚さ 40 μ m で作製し, 2 群に分類し下記の染色を施した。

1) 1 群の切片に対して 95% エタノール水溶液を用いて作製した 1% cresyl violet 溶液を使用し Nissl 染色を施した。切片はエタノールとキシレンを用いた脱水, 透徹系列により処理し封入, 光学顕微鏡下にて観察した。

2) もう 1 群の切片に対して Neuro Trace green (1: 500, Molecular Probes, Oregon, USA, 0.1 M PBS, pH 7.4, 4°C) へ 30 分間浸漬させた後, 0.1 M PBS (室温) にて 30 分間洗浄を行い, 各切片をスライドガラス上に載せ, Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) にて封入した後, 蛍光顕微鏡にて Vm を含む橋被蓋領域の細胞構築を観察した。蛍光顕微鏡観察には BZ-8000 オールインワン蛍光顕微鏡 (キーエンス, 東京) を使用して, 蛍光顕微鏡画像の撮影を行った。

表1 *GAD-67*と*GLYT-2*のPCRプライマー塩基配列

<i>GAD-67</i> (product size: 233 bp)
5'-primer : CTAAGCTTACCAACCTGCGTCCTACAAC
3'-primer : CGGGATCCGGAGAAGTCCGTCTCTGTGC
<i>GLYT-2</i> (product size: 232 bp)
5'-primer : ACAAGCTTCCCTGAGTCCATTTTGTCTGT
3'-primer : GTGGATCCAGGAGGTGCAGCACTGAGAT

3. GFAP抗体とS100タンパク抗体を用いた免疫組織化学

実験動物29頭において2.と同様に後固定を終えた脳幹部の凍結冠状断連続切片をクリオスタットにて厚さ40 μ mで作製し、切片を2群に分け、1群の切片をウサギ抗GFAP抗体(1: 1000, Chemicon, Pittsburgh, PA, USA, 0.1 M PBS, pH 7.4, 4 $^{\circ}$ C)で、もう一群の切片をマウス抗S100抗体(1: 1000, Chemicon, Pittsburgh, PA, USA, 0.1 M PBS, pH 7.4, 4 $^{\circ}$ C)に24時間浸漬し、ビオチン化二次抗体(1: 500, DAKO, Glostrup, Denmark, 0.1 M PBS, pH 7.4, 4 $^{\circ}$ C)へ1時間の浸漬の後に、Cy3標識ストレプトアビジン(1: 500, SIGMA, Missouri, USA, 0.1 M PBS, pH 7.4, 4 $^{\circ}$ C)へ1時間浸漬させた。一次抗体、二次抗体、蛍光標識ストレプトアビジンに浸漬を行った後は、それぞれ0.1 M PBS(室温)にて1時間洗浄を行っている。次に、免疫組織化学を行った切片を、Neuro Trace green(1: 500, 0.1 M PBS, pH 7.4, 4 $^{\circ}$ C)へ30分間浸漬させた後、0.1 M PBS(室温)にて30分間洗浄を行い、各切片をスライドガラス上に載せ、核染色用の4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)を含有したVectashieldにて封入した後、蛍光顕微鏡にてVmを含む橋被蓋領域の細胞構築を観察した。

4. 逆行性トレーサー投与実験

実験動物20頭において3%イソフルラン(インターベット, 東京)による吸入麻酔下にて、ラットの顎二腹筋前腹に4% Fluoro Gold (FG) (Fluorochrome Inc, Denver, CO, USA)をマイクロシリンジで1.0 μ l微量注入した。FG注入から3日後に脳幹部を摘出し、凍結冠状断連続切片を作製し、S100タンパク抗体での免疫組織化学とNeuro Trace green染色を施し蛍光顕微鏡にてVmを含む橋被蓋領域の細胞構築を観察した。

5. *In situ* hybridization法による*GAD-67*と*GLYT-2*の遺伝子発現観察

実験動物27頭において後固定を終えた脳幹部を通常に従い、パラフィン包埋し、滑走式マイクロトームを用いて厚さ4 μ mの冠状断連続切片を作成し、切片を2群に分け、それぞれに対して*GAD-67*、*GLYT-2*の各プローブを用いて*in situ* hybridization法を行った。プローブ

は、脳からISOGEN(ニッポンジーン, 東京)を使用して抽出したtotal RNAを用いて、設計した各種プライマー(表1)にて、RT-PCRを行い、pGEM4Zベクター(プロメガ, 東京)に組み入れ、各種digoxigenin (DIG)標識RNAプローブの合成をDIG RNA Labeling Kit (Roche Diagnostics, 東京)を用いて行った。各切片はキシレンで脱パラフィン後、エタノールにて脱水を行い、4% paraformaldehydeを含む0.1 M PBS (pH 7.4)にて15分間固定した後に、0.1 M triethanol amine/0.25%無水酢酸にてアセチル化を行った。次に50% Formamide/2 \times SSCで42 $^{\circ}$ C, 30分間プレハイブリダイゼーションを行い、次にhybridization buffer (50% Formamide, 2 \times SSC, 1 μ g/ μ l RNA, 1 μ g/ μ l Sonicated salmon sperm DNA, 1 μ g/ μ l BSA, 10% Dextran sulfate)に各種プローブを最終濃度1 μ g/mlになるように加え、42 $^{\circ}$ Cにて16時間反応を行った後、通常に従い洗浄、脱水を行い、nitroblue tetrazolium (NBT)/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP)にて16~24時間発色反応を行った。反応終了後、90%グリセロールで封入を行い、光学顕微鏡下で*GAD-67*と*GLYT-2*遺伝子発現を示すNBT/BCIP反応産物を含む三叉神経上核ニューロンの分布およびその細胞の大きさを観察した。細胞の大きさはNissl染色で核小体が明瞭に観察される神経細胞を選び、隣接切片で*GAD-67*と*GLYT-2*遺伝子発現を示す細胞の長径と短径を計測した。計測した値はそれぞれ平均値と標準偏差を求め、t検定を行った。

結 果

1. 橋被蓋におけるNissl染色およびNeuro Trace greenによる蛍光Nissl染色像

Nissl染色を施したラットVm領域を含む脳幹領域の冠状断切片を細胞構築学的に観察した結果、実験動物では脳幹の橋被蓋における小細胞性網様体の背外側部に、多極性でNissl物質の豊富な大型神経細胞の集合体としてVmが観察された。また、結合腕(上小脳脚)の腹内側部にも比較的大型の神経細胞集団として咀嚼筋の筋紡錘や歯根膜からの感覚を受容する末梢性の感覚ニューロンによって構成されているVmesが観察され、さらにVmesの内側には中型および小型の神経細胞集団としてノルアドレナリン作動性ニューロン群である青斑核が観察された(図1)。一方、同部位をNeuro Trace greenで標識した結果、蛍光顕微鏡下においてもVm, Vmes, そして青斑核などの大型、中型そして小型の神経細胞群やその周囲の小細胞性網様体に存在する細胞などが明瞭に観察されたことより、Neuro Trace greenは通常のNissl染色と同様の対比

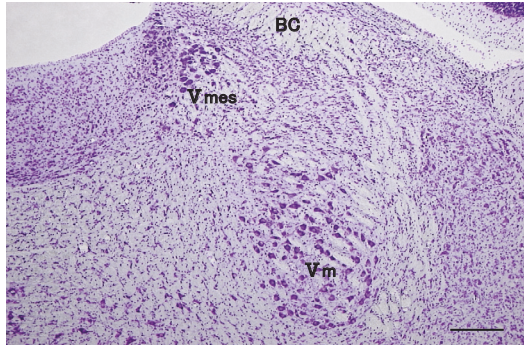


図1 三叉神経運動核を含む橋被蓋領域のNissl染色像
Vm: 三叉神経運動核, Vmes: 三叉神経中脳路核, BC: 結合腕
scale bar = 300 μ m

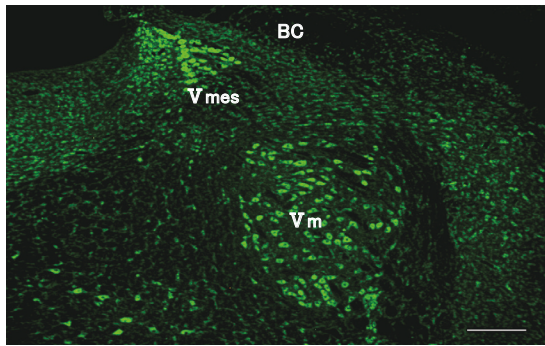


図2 三叉神経運動核を含む橋被蓋領域のNeuro Trace green
による蛍光Nissl染色像
Vm: 三叉神経運動核, Vmes: 三叉神経中脳路核, BC: 結合腕
scale bar = 300 μ m

染色が可能であることが示された (図2)。

2. GFAP免疫陽性細胞の分布

Vmを含む橋被蓋領域の冠状断切片におけるGFAP抗体を用いた蛍光免疫染色の結果, Vmの外側, つまりVmとVpとの間に存在する三叉神経間領域などを含む, Vm周囲の網様体には突起を持った多くのGFAP免疫陽性細胞が存在することがわかった。そして, これら網様体には, Vmや顔面神経核, そして舌下神経核などに投射線維を送る運動前ニューロンが多く存在していることが知られている。その一方で, Vm内のGFAP免疫陽性細胞はわずかに存在するのみであった。そして, そのVm内のGFAP免疫陽性細胞も運動核内の血管壁周囲などに限局して存在していた (図3)。しかし, DAPIによる核染色を施した結果, Vm内にはNeuro Trace greenで標識された神経細胞やGFAP免疫陽性細胞以外の多数のDAPI染色のみされた細胞が分布していることがわかった (図4)。

3. S100タンパク免疫陽性細胞の分布

次に, GFAPと同様にVmを含む橋被蓋領域の冠状断切片においてS100タンパク抗体を用いた蛍光免疫

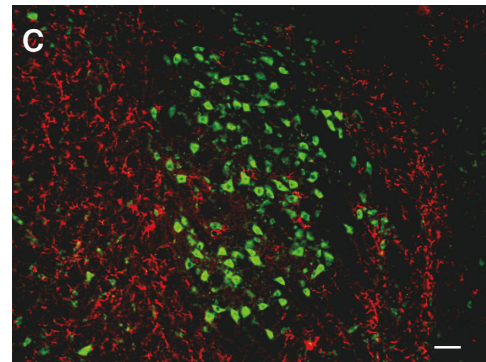
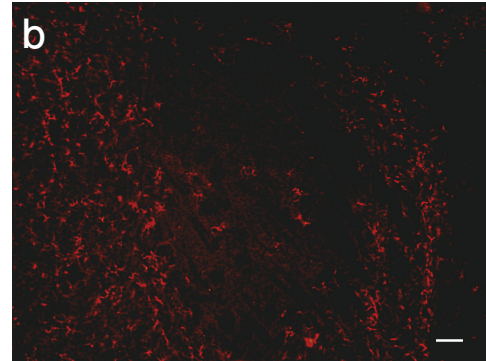
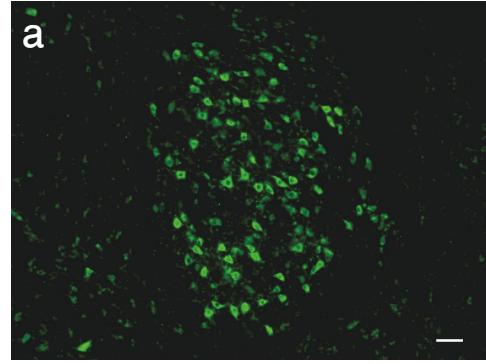


図3 三叉神経運動核および周囲領域におけるGFAP免疫陽性細胞
a : Neuro Trace green, b : GFAP, c : merge
scale bar = 100 μ m

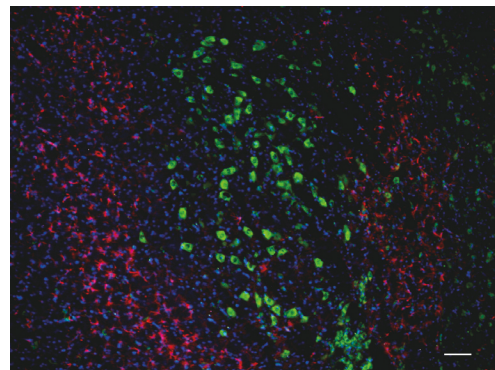


図4 三叉神経運動核および周囲領域におけるNeuro Trace greenとDAPIとGFAPの3重染色
(scale bars=100 μ m)

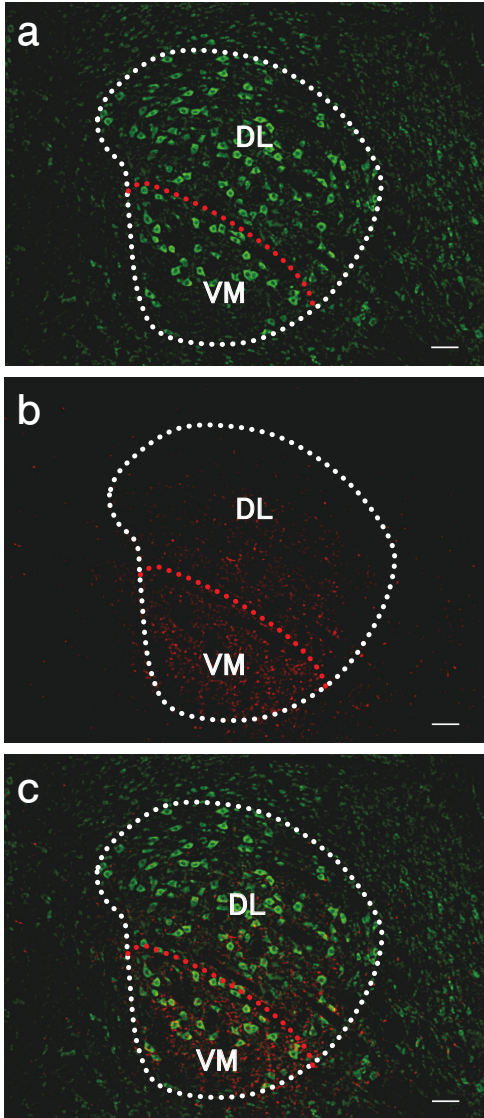


図5 三叉神経運動核および周囲領域におけるS100免疫陽性細胞の分布
 a: Neuro Trace green, b: S100, c: merge,
 VM: 三叉神経運動腹内側亜核, DL: 三叉神経運動背外側亜核
 scale bar = 100 μm

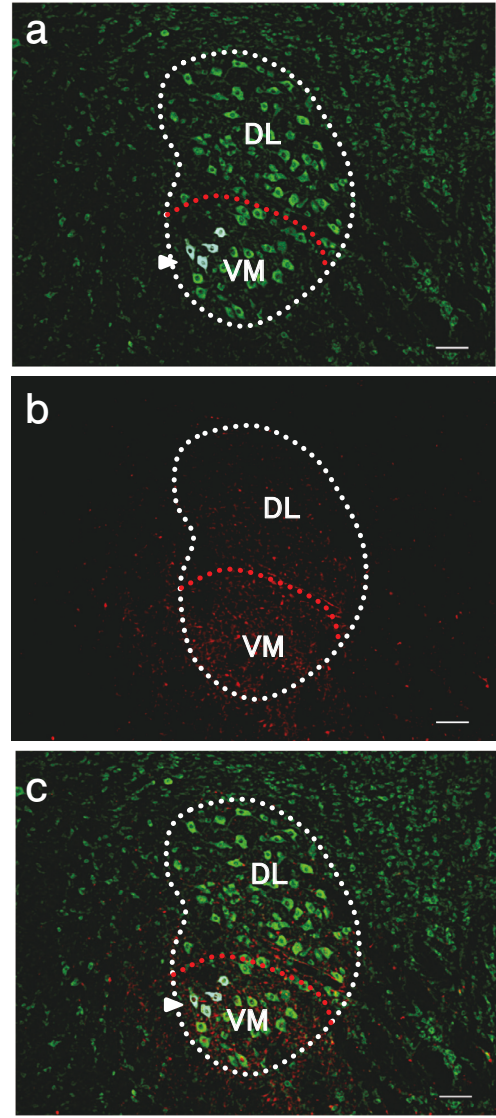


図6 顎二腹筋前腹支配ニューロンを含む三叉神経運動核尾側領域におけるS100免疫陽性細胞の分布
 a: Neuro Trace green, b: S100, c: merge,
 VM: 三叉神経運動腹内側亜核, DL: 三叉神経運動背外側亜核
 scale bar = 100 μm

染色を施した結果, Vm内にはS100タンパク免疫陽性細胞が多数認められた。また, GFAPとは異なり, S100タンパク免疫陽性細胞はVm周囲の小細胞性網様体よりもむしろVmの内部に密に分布していた。さらに興味深いことは, S100タンパク免疫陽性細胞がVm内の腹内側亜核に多く観察された(図5)。

4. 逆行性トレーサー投与実験

顎二腹筋前腹に注入したFGで標識されたニューロンはVmの吻側領域には存在せず,尾側領域に多数認められた(図6, 図7)。また, S100タンパク免疫陽性細胞は, FG標識ニューロンを含む三叉神経運動核の

尾側領域では腹内側亜核に多く観察されたが(図6), FG標識ニューロンの存在しない吻側領域においては, 中間領域や尾側領域に認められるようなS100タンパク免疫陽性細胞の分布密度の明瞭な違いは観察されなかった(図7)。

5. 三叉神経上核(sV)におけるGAD-67とGLYT-2の遺伝子発現細胞の分布

次に, Vmに投射線維を送る抑制性の運動前ニューロンが存在することが知られている三叉神経上核(sV)はVmの背側に接し, かつ結合腕旁核の腹内側に位置しており, 核内には紡錘形や卵円形をした小

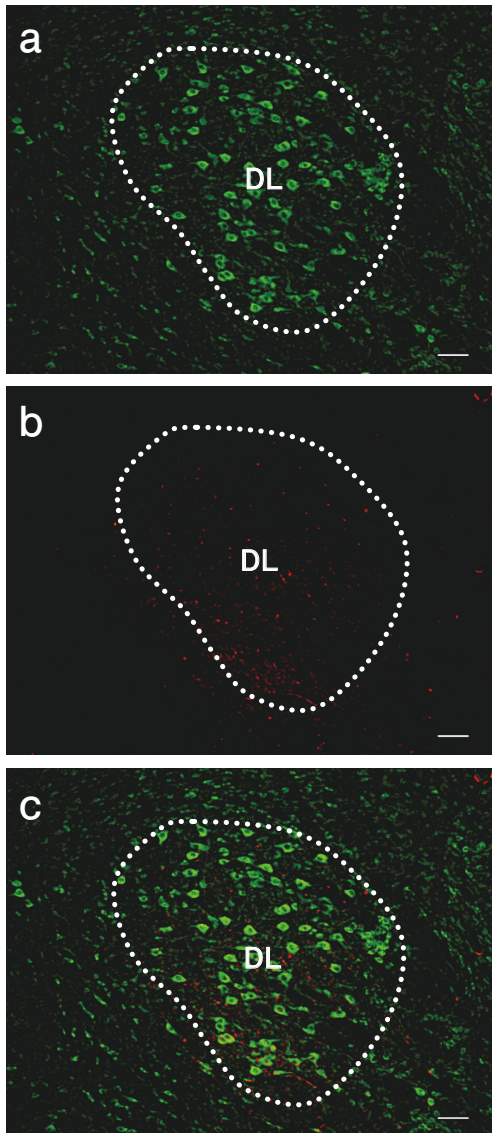


図7 顎二腹筋前腹支配ニューロンを含まない三叉神経運動核吻側領域におけるS100免疫陽性細胞の分布
a: Neuro Trace green, b: S100, c: merge,
DL: 三叉神経運動背側外側垂核
scale bar = 100 μm

型のニューロンが存在していた(図8, 図9)。そして, GABA作動性ニューロンとグリシン作動性ニューロンのマーカーであるGAD-67とGLYT-2の各RNAプローブを用いた*in situ* hybridization法を行った結果, sVにはその細胞体内が顆粒状に強く染まったGAD-67とGLYT-2の遺伝子発現細胞が認められた。そして, それら遺伝子発現細胞にはGAD-67あるいはGLYT-2のどちらか一方の遺伝子を発現する細胞も存在するが, GAD-67とGLYT-2の両方の遺伝子を発現している細胞も存在することが観察された(図10)。また, GAD-67とGLYT-2の遺伝子発現細胞の

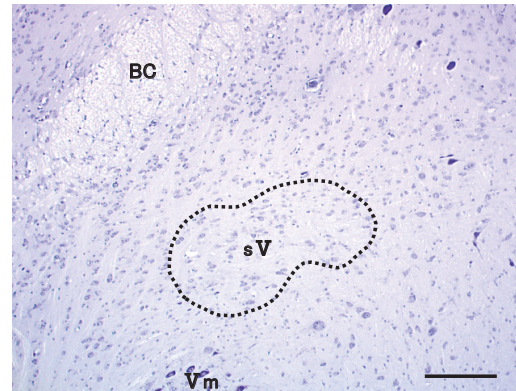


図8 三叉神経上核を含む橋被蓋領域のNissl染色像
Vm: 三叉神経運動核, sV: 三叉神経上核, BC: 結合腕
scale bars=200 μm

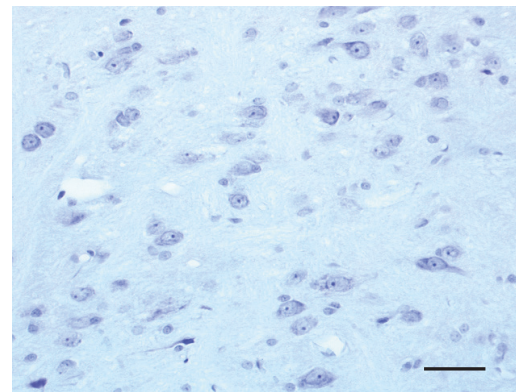


図9 三叉神経上核の拡大像(Nissl染色) scale bars=50 μm

大きさを計測した結果, GAD-67遺伝子発現細胞(244個)は, 長径 $20.6 \pm 3.4 \mu\text{m}$ (mean \pm SD), 短径 $15.9 \pm 2.2 \mu\text{m}$ (mean \pm SD), 一方GLYT-2遺伝子発現細胞(106個)は, 長径 $24.0 \pm 2.8 \mu\text{m}$ (mean \pm SD), 短径 $17.4 \pm 2.2 \mu\text{m}$ (mean \pm SD)で, 長径および短径ともにGLYT-2遺伝子発現細胞の方がGAD-67遺伝子発現細胞より有意($p < 0.01$)に大きいことがわかった。(表2)。

考 察

1. Nissl染色およびNeuro Trace greenによる蛍光Nissl染色像

Nissl染色は, 脳および脊髄神経細胞を可視化する標準的な組織学的方法である。Nissl物質は, 神経細胞形質および樹状突起中の粗面小胞体由来のリボソームRNAから構成されており, 損傷を受けたか, または再生中の神経細胞体内に再分布されることから, 神経細胞の生理学的状態を示すマーカーでもある。本研究で使用したNeuro Trace greenも, 所見から神経細

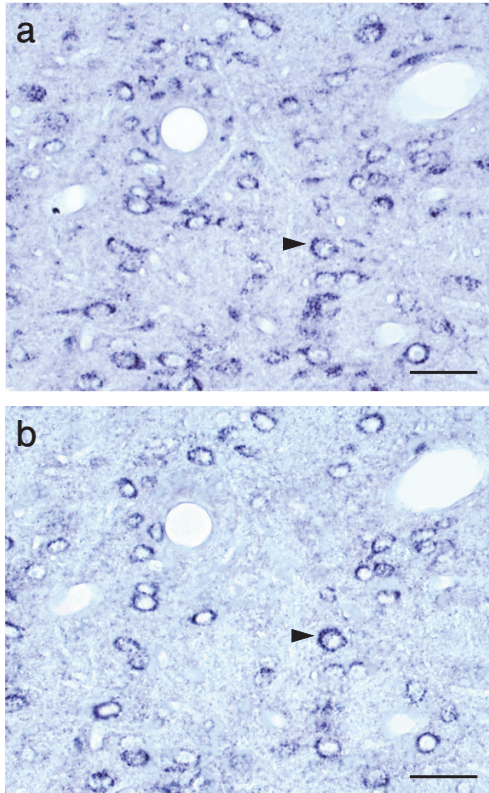


図10 三叉神経上核における *GAD-67* と *GLYT-2* の遺伝子発現細胞の分布

a: *GAD-67*, b: *GLYT-2*.

矢頭: *GAD-67* と *GLYT-2* の両方の mRNA を発現している細胞

scale bar = 50 μ m

胞に特徴的な Nissl 物質に選択的に結合し、トルイジンブルーやクレシルバイオレットなど他の組織学的 Nissl 染色試薬と同等に使用することが可能であることがわかった。よって、本研究でおこなった様な免疫蛍光抗体法を用いた場合には、その対比染色として有用な試薬であると考えられる。

2. GFAP 免疫陽性細胞および S100 タンパク免疫陽性細胞の分布

本研究では、グリア系細胞マーカーとしてとくにアストロサイト（星状膠細胞）のマーカー分子として知られている GFAP と S100 タンパクの局在について検索を行った²⁰⁻²⁴。GFAP は、アストロサイトに特異的に見られる分子量約 50 kDa の細胞骨格タンパク（中間径フィラメント）である。また、GFAP の発現は、脳損傷、認知症、プリオン病、多発性硬化症などの神経疾患で増加することも知られている^{25, 26}。一方、S100 タンパクは分子量約 10 kDa のカルシウム結合タンパクの 1 つである。中枢神経系では GFAP と同様にアストロサイトなどに見られる。それ以外に末梢

表2 *GAD-67* 遺伝子発現細胞と *GLYT-2* 遺伝子発現細胞の長径と短径

	<i>GAD-67</i> 遺伝子発現細胞 (244)	<i>GLYT-2</i> 遺伝子発現細胞 (106)
長径 (μ m)	20.6 \pm 3.4	24.0 \pm 2.8*
短径 (μ m)	15.9 \pm 2.2	17.4 \pm 2.2*

*: $p < 0.01$

神経系では Schwann 細胞, satellite cell (神経節細胞) などに見られる^{27, 28}。臨床的には神経膠腫などのマーカータンパクとしても知られている²⁹⁻³²。

最近、S100 タンパクが、カイニン酸投与による神経活動の上昇に伴って海馬ニューロンで分泌されることや、分泌された S100 タンパクがアストロサイトからニューロンへのシグナル伝達物質として働き、ニューロン活動を調節している事実が報告されていることや³³、過去のトレーサー実験により Vm の背外側亜核には咬筋、側頭筋といった閉口筋を支配する運動ニューロンが局在し、一方、腹内側亜核には顎舌骨筋や顎二腹筋前腹などの開口筋の運動ニューロンが分布することが報告されている³⁴⁻³⁶。

本研究結果において、Vm 内にはアストロサイトのマーカー分子である GFAP の発現は少数が観察されたのみであった。一方、Vm 内には同じくアストロサイトのマーカー分子のひとつである S100 タンパクの発現が多数認められた。さらに興味深いことに、S100 タンパクが顎二腹筋前腹支配ニューロンを含む Vm 内の腹内側亜核に多く観察された。以上の結果より、Vm に存在する S100 陽性細胞が咀嚼運動の中でも特に開口運動を制御する神経回路網に関与する可能性が示された。

3. 三叉神経上核 (sV) における *GAD-67* と *GLYT-2* の遺伝子発現細胞の分布

次に、三叉神経上核 (sV) には *GAD-67* と *GLYT-2* の遺伝子発現細胞が認められ、その中のいくつかの細胞において *GAD-67* と *GLYT-2* の両方の遺伝子発現をしていることが観察された。また、各遺伝子発現細胞の大きさを計測した結果では、ともに紡錘形や卵円形の細胞形態を示したが、*GAD-67* 発現細胞と比べて、*GLYT-2* 発現細胞の方が長径・短径ともに平均値が大きいことから、*GLYT-2* は sV 内のやや大型の細胞に多く発現することが示された。これらの結果は、中枢神経系において抑制性神経伝達物質である GABA とグリシンを共発現するニューロンが報告がされていることや^{18, 19}、sV には GABA 作動性ニューロンとグリシン作動性ニューロンが存在しているという免疫組織化学的な報告と一致している⁹。今後、これらの発現の胎生

期や生後の発達段階における経時的な変化を観察することで、顎運動を形成する神経回路の形成機序の解明に繋がりたいと考えている。

結 論

顎運動の神経回路網を形成する閉口筋運動ニューロンや開口筋運動ニューロンとグリア細胞の関係について、グリア細胞マーカーを用いてその構造を観察したところ、以下の結論を得た。

1. ラットにおいてGFAP陽性細胞は三叉神経運動核 (Vm) の周囲の小細胞性網様体に多数が観察された。
2. S100タンパク陽性細胞は三叉神経運動核内 (Vm) に多数が標識され、特に顎二腹筋支配ニューロンを含む腹内側亜核に密に分布した。

以上の結果およびS100タンパクがアストロサイトからニューロンへのシグナル伝達物質として働き、ニューロン活動を調節しているという報告や種々の実験動物を用いた研究により三叉神経運動核 (Vm) の腹内側亜核は開口筋を支配する運動ニューロンから構成されるという報告から、三叉神経運動核 (Vm) に存在するS100陽性細胞が咀嚼運動の中でも特に開口運動を制御する神経回路網に関与することが示された。

また、三叉神経上核 (sV) に存在するニューロンにおいて、*GAD-67*と*GLYT-2*の遺伝子発現を観察したところ、以下の結論を得た。

1. 三叉神経上核 (sV) には*GAD-67*と*GLYT-2*の遺伝子発現細胞が認められた。また、その中のいくつかの細胞において*GAD-67*と*GLYT-2*の両方の遺伝子発現をしていることが観察された。
2. *GAD-67*と*GLYT-2*発現細胞の形態はともに紡錘形や卵円形を示したが、細胞の大きさの平均値を比較した結果、*GLYT-2*を発現する細胞は大型のものが多く示された。

これらの結果は、三叉神経上核 (sV) にはGABA作動性ニューロンとグリシン作動性ニューロンが存在しているという免疫組織化学的な報告と一致していた。今後、これらの遺伝子発現の変化を発達段階において経時的に観察することで、顎運動を形成する神経回路の形成機序の解明に繋がりたいと考えている。

謝 辞

論文作成にあたり御校閲と有益な御教示をいただきました人体構造学講座肉眼解剖学・臨床解剖学分野高橋常男教授、顎顔面診断科学講座病理学分野榎木恵一教授に厚く御礼申し上げます。また、本研究を遂行するにあたり、終

始多大なる御協力を頂いた本学人体構造学講座組織学分野の教室員各位に深く感謝を申し上げます。本論文の要旨は、神奈川歯科大学学会第45回総会（平成22年12月4日、横須賀）、神奈川歯科大学第47回総会（平成24年12月1日、横須賀）において発表した。

参考文献

1. Nicholls JG, Kuffler SW. Na and K content of glial cells and neurons determined by flame photometry in the central nervous system of the leech. *J Neurophysiol* **28**: 519-525, 1965.
2. Kuffler SW, Nicholls JG. The physiology of neuroglial cells. *Ergeb Physiol* **57**: 1-90, 1966.
3. Kuffler SW, Nicholls JG, Orkand RK. Physiological properties of glial cells in the central nervous system of amphibia. *J Neurophysiol* **29**(4): 768-787, 1966.
4. Haydon RG. Listening and talking to the synapse. *Nat Rev Neurosci* **2**(3): 185-193, 2001.
5. Fields RD, Stevens-Graham B. New insights into neuron-glia communication. *Science* **298**: 556-562, 2002.
6. Mizuno N, Yasui Y, Nomura S, Itoh K, Konishi A, Takada M, Kudo M. A light and electron microscopic study of premotor neurons for the trigeminal motor nucleus. *J Comp Neurol* **215**(3): 290-298, 1983.
7. Kamogawa H, Manabe K, Kondo M, Naito K. Supra and juxtatrigenial inhibitory premotor neurons with bifurcating axons projecting to masseter motoneurons on both sides. *Brain Res* **639**: 85-92, 1994.
8. Minkels RF, Juch PJW, Van Willigen J. Interneurons of the supratrigeminal area mediating reflex inhibition of trigeminal and facial motoneurons in the rat. *Archs oral Biol* **40**(4): 275-284, 1995.
9. Li YQ, Takada M, Kaneko T, Mizuno N. GABAergic and glycinergic neurons projecting to the trigeminal motor nucleus: a double labeling study in the rat. *J Comp Neurol* **373**: 498-510, 1996.
10. Li JL, I, Kaneko T, Nomura S, Mizuno N. Projections from the caudal spinal trigeminal nucleus to commissural interneurons in the supratrigeminal region: an electron microscope study in the rat. *Neurosci Lett* **254**: 57-60, 1998.
11. Li YQ, Tao FS, Okamoto K, Nomura S, Kaneko T, Mizuno N. The supratrigeminal region of the rat sends GABA/glycine-containing axon terminals to the motor trigeminal nucleus on the contralateral side. *Neurosci Lett* **330**: 13-16, 2002.
12. Li JL, Wu SX, Tomioka R, Okamoto K, Nakamura K, Kaneko T, Mizunod N. Efferent and afferent connections of GABAergic neurons in the supratrigeminal and the intertrigenial regions an immunohistochemical tract-tracing study in the *GAD67-GFP* knock-in mouse. *Neurosci Res* **51**: 81-91, 2005.
13. McDavid S, Lund JP, Auclair F, Kolta A. Morpho-

- logical and immunohistochemical characterization of interneurons within the rat trigeminal motor nucleus. *Neurosci* **139**: 1049-1059, 2006.
14. Mizuno N, Nomura S, Itoh K, Nakamura Y, Konishi A. Commissural interneurons for masticatory motoneurons: a light and electron microscope study using the horseradish peroxidase tracer technique. *Exp Neurol* **59**(2): 254-262, 1978.
 15. Kolta A, Westberg KG, Lund JP. Identification of brainstem interneurons projecting to the trigeminal motor nucleus and adjacent structures in the rabbit. *J Chem Neuroanat* **19**(3): 175-195, 2000.
 16. Shigenaga Y, Hirose Y, Yoshida A, Fukami H, Honma S, Bae YC. Quantitative ultrastructure of physiologically identified premotoneuron terminals in the trigeminal motor nucleus in the cat. *J Comp Neurol* **426**(1): 13-30, 2000.
 17. Bae YC, Choi BJ, Lee MG, Lee HJ, Park KP, Zhang LF, Honma S, Fukami H, Yoshida A, Ottersen OP, Shigenaga Y. Quantitative ultrastructural analysis of glycine- and gamma-aminobutyric acid-immunoreactive terminals on trigeminal alpha- and gamma-motoneuron somata in the rat. *J Comp Neurol* **442**(4): 308-319, 2002.
 18. Maxwell DJ, Todd AJ, Kerr R. Colocalization of glycine and GABA in synapses on spinomedullary neurons. *Brain Res* **690**(1): 127-132, 1995.
 19. Dumba JS, Irish PS, Anderson NL, Westrum LE. Electron microscopic analysis of gamma-aminobutyric acid and glycine colocalization in rat trigeminal subnucleus caudalis. *Brain Res* **806**(1): 16-25, 1998.
 20. Bignami A, Eng LF, Dahl D, Uyeda CT. Localization of the glial fibrillary acidic protein in astrocytes by immunofluorescence. *Brain Res* **43**(2): 429-435, 1972.
 21. Bignami A, Dahl D. Astrocyte-specific protein and neuroglial differentiation. An immunofluorescence study with antibodies to the glial fibrillary acidic protein. *J Comp Neurol* **153**(1): 27-38, 1974.
 22. Benitz WE, Dahl D, Williams KW, Bignami A. The protein composition of glial and nerve fibers. *FEBS Lett* **66**(2): 285-289, 1976.
 23. Ludwin SK, Kosek JC, Eng LF. The topographical distribution of S-100 and GFA proteins in the adult rat brain: an immunohistochemical study using horseradish peroxidase-labelled antibodies. *J Comp Neurol* **165**(2): 197-207, 1976.
 24. Tabuchi K, Kirsch WM. Immunocytochemical localization of S-100 protein in neurons and glia of hamster cerebellum. *Brain Res* **92**(1): 175-180, 1975.
 25. Salinero O, Moreno-Flores MT, Ceballos ML, Wandsell F. β -Amyloid peptide induced cytoskeletal reorganization in cultured astrocytes. *J Neurosci Res* **47**(2): 216-223, 1997.
 26. Lazarini F, Deslys JP, Dormont D. Regulation of the glial fibrillary acidic protein, beta actin and prion protein mRNAs during brain development in mouse. *Brain Res Mol Brain Res* **10**(4): 343-346, 1991.
 27. Brockes JP, Fields KL, Raff MC. Studies on cultured rat Schwann cells. I. Establishment of purified populations from cultures of peripheral nerve. *Brain Res* **165**(1): 105-118, 1979.
 28. Stefansson K, Wollmann RL, Moore BW. Distribution of S-100 protein outside the central nervous system. *Brain Res* **234**(2): 309-317, 1982.
 29. Zimmer DB, Van Eldik LJ. Analysis of the Calcium-modulated Proteins, S100 and Calmodulin, and Their Target Proteins During C6 Glioma Cell Differentiation. *J Cell Biology* **108**: 141-151, 1989.
 30. Zimmer DB, Cornwall EH, Landar A, Song W. The S100 protein family: history, function, and expression. *Brain Res Bull* **37**(4): 417-429, 1995.
 31. Salama I, Malone PS, Mihaimeed F, Jones JL. A review of the S100 proteins in cancer. *Eur J Surg Oncol* **34**(4): 357-364, 2008.
 32. Van Eldik LJ, Ehrenfried B, Jensen RA. Production and characterization of monoclonal antibodies with specificity for the S100 beta polypeptide of brain S100 fractions. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**(19): 6034-6038, 1984.
 33. Sakatani S, Seto-Ohshima A, Shinohara Y, Yamamoto Y, Yamamoto H, Itohara S, Hirase H. Neural-activity-dependent release of S100B from astrocytes enhances kainate-induced gamma oscillations *in vivo*. *J Neurosci* **28**(43): 10928-10936, 2008.
 34. Mizuno N, Konishi A, Sato M. Localization of masticatory motoneurons in the cat and rat by means of retrograde axonal transport of horseradish peroxidase. *J Comp Neurol* **164**: 105-116, 1975.
 35. Homma S. Organization of the trigeminal motor nucleus before and after metamorphosis in lamphreys. *Brain Res* **140**(1): 33-42, 1978.
 36. Lynch R. A qualitative investigation of the topographical representation of masticatory muscles within the motor trigeminal nucleus of the rat: a horseradish peroxidase study. *Brain Res* **327**(1-2): 354-358, 1985.
-