

136717624
平成13年度～14年度科学研究費補助金
基盤研究(C)(2) (研究課題番号13671762)

発声運動指令が脳幹聴覚受容機構におよぼす影響の解析

研 究 成 果 報 告 書

平成15年3月

研究代表者 坂 本 尚 志

旭川医科大学医学部教授

平成 13～14 年度科学研究費補助金研究成果報告書

基盤研究(C)(2)課題番号 13671762

発声運動指令が脳幹聴覚受容機構におよぼす影響の解析

研究代表者 坂本尚志 旭川医科大学・医学部・教授

研究分担者 原田広文 旭川医科大学・医学部・助手

交付決定額（配分額）	直接経費	間接経費	合計
平成 13 年度	230 千円	15 千円	245 千円
平成 14 年度	130 千円	60 千円	190 千円
総計	360 千円	75 千円	435 千円

第1章 <研究の要旨>

聴覚フィードバックが、大脳皮質において言語中枢を介して発声運動司令に影響していることは、ヒトにおける感覚性失語症の存在により、容易に理解できる。しかし、皮質下の伝導路の途中において、体性感覚など他の感覚系と同様に、遠心性制御を受けていることも推測されている。しかし、この領域のニューロンレベルにおける研究はヒトにおいては侵襲的な手法を用いることができないので、動物モデルにおける実験が主体となってきた。カナリア、コウモリ、リスザル、ネコ等において慢性モデルや急性モデルにおける実験が行われてきた。しかし、慢性モデルにおいては、発声運動は動物の自発的な発声に依存するしかなく、電気刺激等を用いて、制御して発声を引き起こすことの可能なモデルは少ない。また、急性モデルにおいては、麻酔下に行わなくてはならないことから、発声を誘発することが難しく、実際に発声を誘発しながら解析した研究はほとんど見当たらず、皮質下における発声運動司令による聴覚受容制御の詳細はいまだ明確になっていない。

そこで本研究では、音声生成時に聴覚入力が脳幹レベルでどのような影響を受けるかを、聴覚中継核に存在する神経細胞活動を解析することにより、明らかにすることを目的とした。

第2章 <無麻酔発声動物モデルの作成>

はじめに、実際に発声運動を誘発しながら聴覚受容機構を解析できる動物モデルの開発を行なった。ハロセン麻酔下に、上丘と乳頭体後縁を結ぶ線で脳幹を切断した中脳除脳ネコ precollicular postmammillary decerebrate cat (これは歩行標本として知られている)、を用いた。(図1)

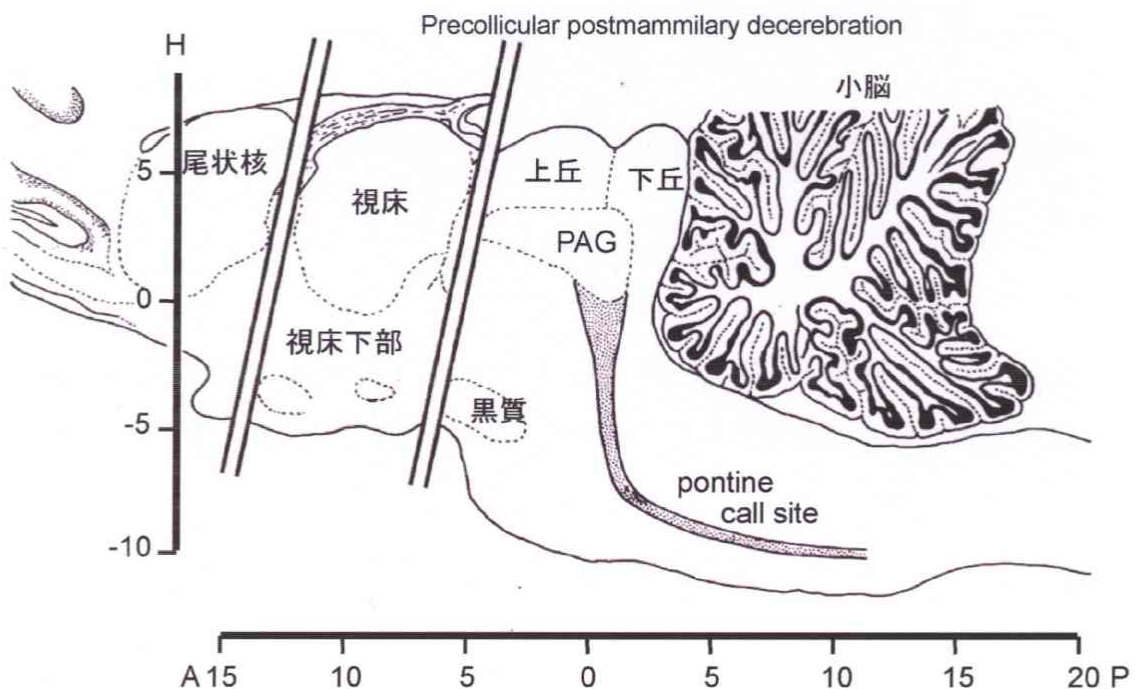


図1 除脳ネコ標本

このモデルでは、除脳されているので、無麻酔で実験が可能である。このモデルの中脳中心灰白質 PAG(periaqueductal gray)に連続微小電気刺激(10-50 μ A, 50Hz, 1-10sec)を加えることにより、発声運動を誘発できる。

連続刺激により、最初に横隔膜の活動を伴う吸息および声門開大筋の活動増大が誘発され、それに引き続いて、声門閉鎖筋と腹直筋の活動を伴う発声が、誘発される。刺激持続中吸息と発声が交互におこり、正常と変わらない

発声運動を誘発することが可能である。(図2)

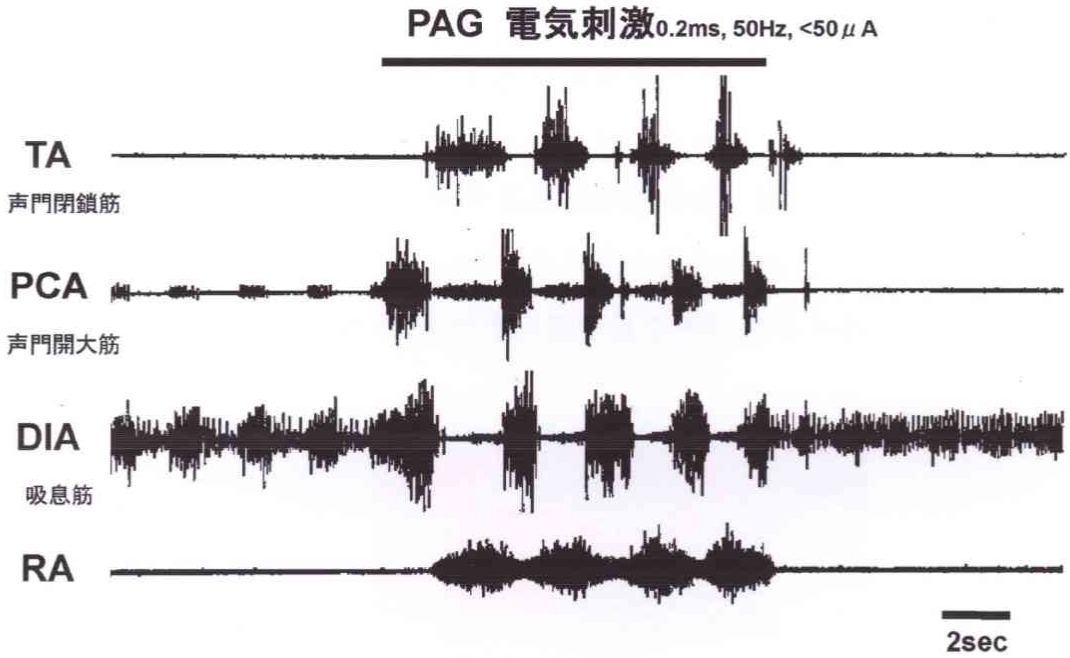


図2 誘発発声時の筋活動

誘発される発声は“meaw” (“ニャー”)であり、音響学的解析より、基本振動数F0およびフォルマントは正常ネコにおけるそれと優位差はないことが確認された。

第3章 <発声中枢からの下行路の検索>

中脳発声中枢に加えた電気刺激により発声運動が誘発されることから、次に中脳中心灰白質に存在する発声中枢からの下行路を解析し、どのような経路で聴覚入力に影響を与えるかを検索する必要があった。麻酔下にネコを脳定位固定装置に固定し、中脳中心灰白質の発声誘発部位に順行性標識物質である PHA-L (Phytohemagglutinin-L) をガラス微小管を用いて 0.1-0.5 μ l 注入した。(図3)

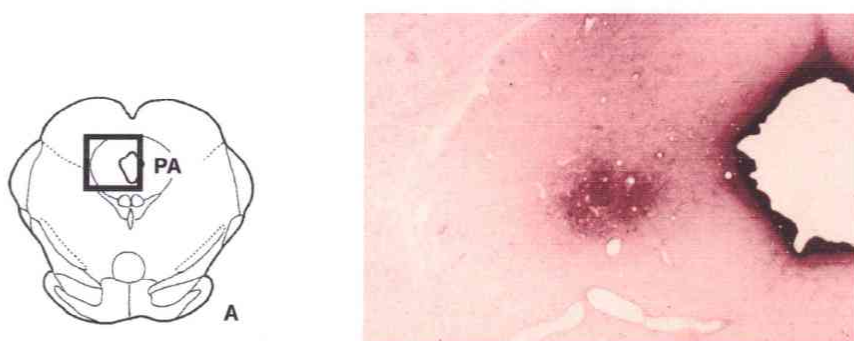


図4 発声誘発部位への標識物質の注入

1mm

5-7日の後、麻酔薬の大量投与下にホルマリンで灌流固定し、免疫組織化学的手法により、発色させ、対比染色を行い、50 μ 切片を光学顕微鏡下で観察し、神経終末の分布を解析した。

神経終末は一部は同レベルの反対側中脳中心灰白質に終止していたが、多くは同側の中脳網様体を下行し、さらに橋腹側部を下行し、延髄後顔面神経核、および後疑核呼吸ニューロン群に終止していた。またその途中で、橋の腹側および背側外側毛帯核にも終止していた。(図4)

しかし、中心灰白質刺激により最初に吸息が誘発されるが、延髄背側部の弧束核に存在する吸息ニューロン群には投射が認められなかった。

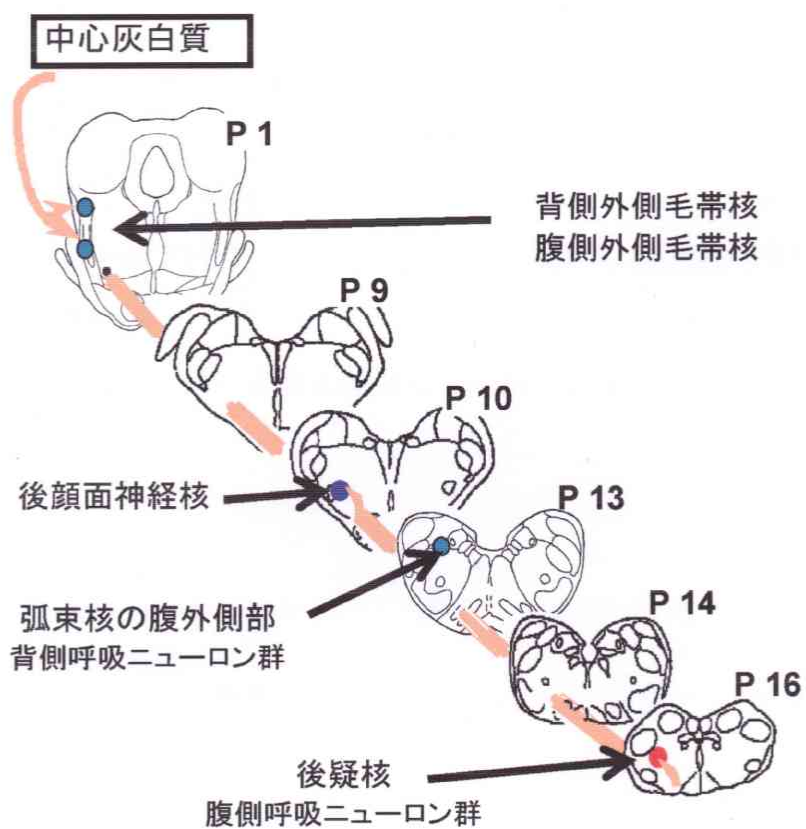


図4 中心灰白質からの下行性投射経路

第4章 <発声中枢からの下行性運動司令の効果の解析>

第1節 <発声運動中枢から延髄呼吸ニューロン群への投射効果の解析>

各々の下行性経路の効果解析するために、次にタングステン微小電極を用い、単一ニューロンの活動を記録・解析し、発声中枢からの運動司令の効果解析した。中脳中心灰白質にもタングステン微小電極を挿入し、30-50 μ A, 50Hz, 5-10sの連続刺激を加え、発声運動を誘発し、運動中の単一ニューロン活動を解析した。

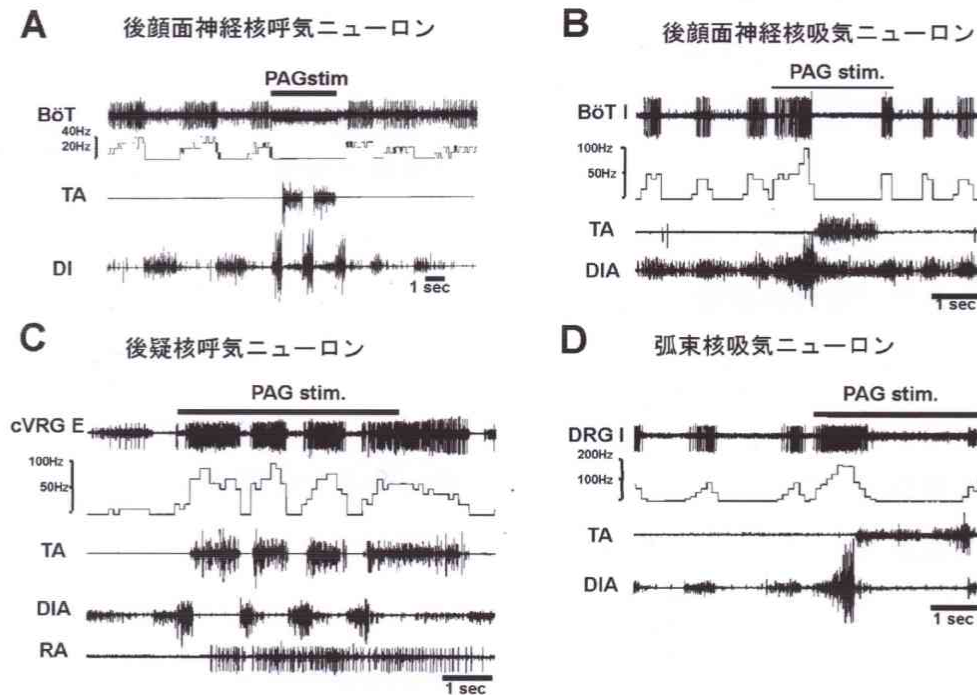


図5 発声運動中の延髄呼吸ニューロン群の発射活動

後顔面神経核に存在する呼気ニューロンは、吸息相にはその発射が停止し、呼息相にその発射が次第に漸増するが、発声運動中枢である中脳中心灰白質の刺激を呼息相に開始すると、短潜時でその発射が抑制され、刺激持続中その抑制は持続した。(図5A) この呼気ニューロンは延髄背側部の弧束核に存在する

吸気ニューロンを抑制していることが知られており、中心灰白質の刺激によりその発射が抑制されることは、呼息相に開始した刺激がすぐに吸息を引き起こし、引き続いた発声運動を誘発することを示唆している。

吸気相には発射がないので、吸気相に開始した刺激では更なる抑制効果は確認できないが、発声運動中枢からの効果は抑制性であることが推測される。

後顔面神経核には吸気中にのみ持続的に発射する吸気ニューロンが存在するが、このニューロンは呼気相に開始した刺激に対し、短潜時で活動を開始し、その発射が発声運動に先行する吸気中に増大した。(図5B) このニューロンは延髄背側部の弧束核に存在する吸気ニューロンに興奮性に接続することが明らかとなっており、このニューロンの活動により、呼息相に開始した中心灰白質刺激開始でも、すぐに吸息が開始することが推測された。

弧束核に存在する呼気ニューロンの活動は実際刺激開始直後に増大した。(図5D) このニューロンは脊髄に投射し、吸気筋である横隔膜支配運動神経細胞に興奮性に接続していることから、呼息相に開始した中心灰白質刺激によりすぐに吸息が開始するのは、このニューロンの活動が後顔面神経核に存在する吸気ニューロンにより増大することが明らかとなった。

一方、後疑核の呼気ニューロンは、吸息相にはその発射が停止し、呼息相にその発射が持続的に増加するが、発声運動中枢である中脳中心灰白質の刺激を呼息相に開始しても、吸息相に開始しても、いずれの場合にも、短潜時でその発射が増大した(図5C)

以上のことから、中脳中心灰白質の刺激により吸息から開始する発声運動が誘発される機構は以下のようにまとめられる。

安静呼吸時、呼息相では後顔面神経核の呼気ニューロンがその活動を漸増させ、弧束核の吸気ニューロンを抑制し、呼息が起こっている。

中心灰白質の刺激が呼息相に開始すると、後顔面神経核の呼気ニューロンの活動が抑制され、結果として弧束核吸気ニューロンの脱抑制 disinhibition を引き起こし、結果的に横隔膜活動を増大させ、吸息が開始する。一方吸息相に

刺激が開始されると、後顔面神経核の吸気ニューロンの活動が増大し、弧束核吸気ニューロンの活動も増大し、更なる吸息の増大が引き起こされる。このように、吸息、呼息どちらの位相で刺激を開始しても吸息から開始する発声運動が誘発されることが明らかとなった。(図6)

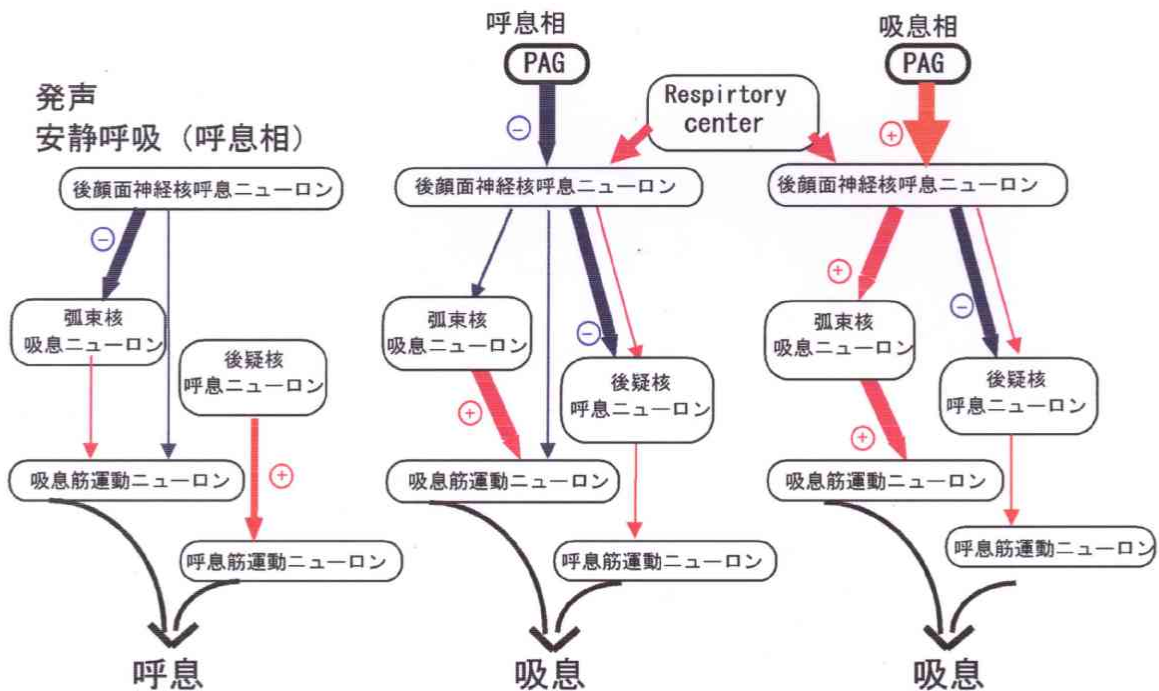


図6 中心灰白質刺激時の延髄呼吸ニューロン群による吸息の開始

以上のことから、中心灰白質刺激からの下行路による発声運動司令は、下位のニューロンに対して、興奮性と抑制性の両者の効果を及ぼすことが明らかとなった。

果たして、単一のニューロンが異なるニューロンに興奮性および抑制性の両者の効果を示すのか、または中脳中心灰白質には異なる二種類のニューロンが存在し、刺激により両者が同時に活動し、興奮性および抑制性の効果を及ぼすのかを明らかにする必要がある。

第2節<中脳中心灰白質からの下行性投射起始細胞の検索>

後顔面神経核には抑制性の効果、後疑核には興奮性の効果を示したニューロンが多かったため、この二箇所への投射が単一の細胞から起始しているのか、あるいは異なる細胞から起始しているかを明らかにするために、異なる二種類の逆行性標識物質を延髄の後顔面神経核および後疑核に注入し、中脳中心灰白質内の細胞を検索した。

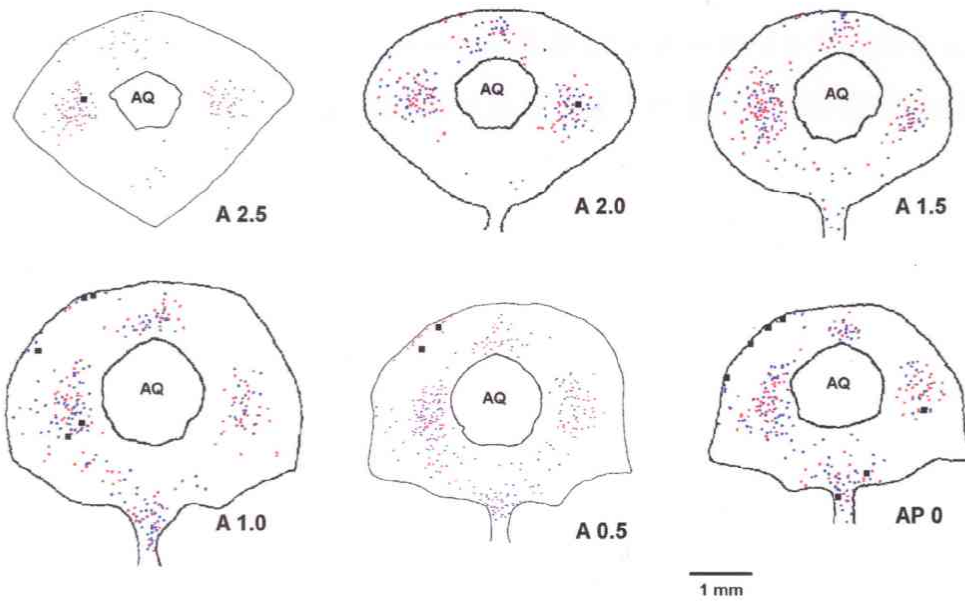


図6 中心灰白質からの下行性投射起始細胞
(青：後顔面神経核、赤：後疑核、■：両者)

図6に示すように、後顔面神経核および後疑核両者に投射する細胞は、中脳中心灰白質ではごく僅かでも発声中枢とはことなる部位に検出された。このことは、中脳中心灰白質の発声中枢の単一のニューロンから興奮性および抑制性の投射が起始しているのではなく、異なる細胞群から興奮性および抑制性の下行性投射がそれぞれ起始していることが明らかとなった。

第5章<発声運動中枢からの運動司令の聴覚受容機構への影響の解析>

順行性標識物質による下行路の検索において終末の認められた腹側および背側外側毛帯核は聴覚中継核であることから、中脳の発声中枢からの発声運動司令がこの部位で聴覚受容機構に影響を与えている可能性が考えられたので、次に聴覚受容ニューロンの活動の解析に進んだ。

第1節<聴覚受容ニューロンの検索>

発声時には、聴覚経路からは自ら発した声がフィードバック信号として入ってくるので、最初に中心灰白質刺激により誘発される発声の音響学的分析を行なった。

基本周波数 F0 はほぼ 300Hz であり、自発発声時の基本周波数とほぼ同じであり、除脳標本における発声運動が正常動物における発声とほぼ同様のフィードバック信号を聴覚受容機構におよぼしていると考えてよいことが明らかとなった。

次に、聴覚中継核ニューロンに対する、中脳中心灰白質の刺激効果の解析を行なった。中脳中心灰白質にタングステン微小電極を刺入し、発声を誘発できる刺激強度 (30–50 μ A) で刺激を加えた。神経終末の認められた外側毛帯腹側核および背側核にタングステン微小電極を刺入し、その応答の解析を試みた。

中脳発声中枢からの単一刺激に対する応答性は、発声を誘発する刺激強度の範囲では、顕著な効果を示すニューロンは殆ど認められなかった。刺激強度を強くすると (100 μ A)、促通効果が認められる細胞の方が多く存在する傾向が認められたが、抑制効果が認められる細胞も存在した。しかし、自発発射活動も少なく、抑制効果の確認が難しく、細胞外記録で抑制性を証明するための自発発射に対する peristimulus time histogram の作成が、予想していたよりも困難で、十分な成果を出すに至っていない。現在まで得られた成果は統計的に有意な変化とはいえず、未だ公表するに至っていない。刺激効果を更に明らかに

するために、今後は聴覚刺激に対する誘発反応のrecovery curveの作成により、中脳発声中枢からの入力様式を解析する方法を検討中である。また、発声の基本振動数、およびフォルマントの経時的変化に対応した周波数応答特性の解析は、発声運動中の安定した細胞記録が予想外に困難で、未だ十分な成果を出すに至っていない。

第6章<発声運動発現における運動司令と末梢性フィードバック機構>

随意運動である言語運動発現においては、大脳皮質の言語関連皮質から口腔や顔面の筋を司る運動ニューロンへの構音のための運動司令と、呼息時に声帯を閉鎖する発声のための運動司令が必要である。(図7)

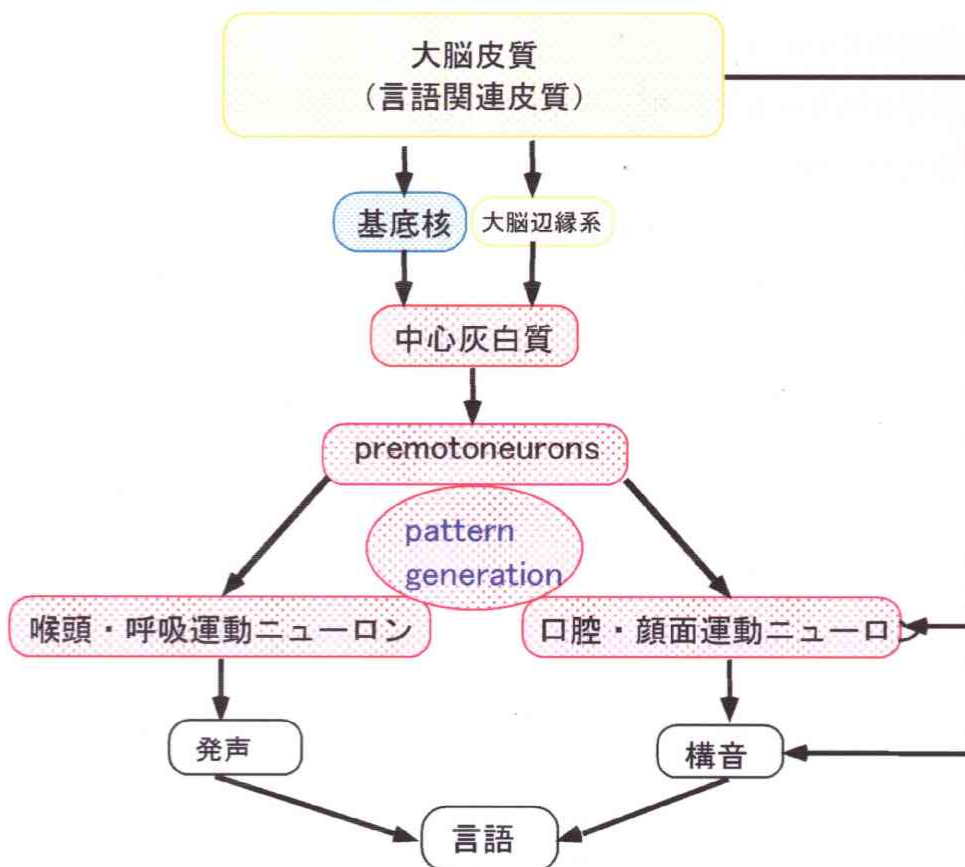


図7 発声運動発現のための中枢神経機構模式図

言語はヒトにおいてのみ存在する機能であるが、ヒトと動物において共通する発声運動発現機構は動物モデルを用いて解析することが可能である。研究代表者はこれまで、大脳基底核の黒質網様部からの抑制性出力が、中脳中心灰白質の発声運動中枢を持続的に抑制していること、およびその抑制性出力がなく

なることによる脱抑制により発声運動が発現することを明らかとしてきた（図 8 A）（参考文献）。

また、そのような上位運動中枢からの運動司令が発声運動を発現するに当たって、末梢性フィードバック機構の機能的役割も明らかにしてきた。実際の発声運動中に喉頭粘膜を支配する上喉頭神経の単一感覚線維を記録することにより、発声運動中の声帯振動の基本振動数 F0 が忠実に中枢にフィードバックされていることが明らかとなっている（図 8 B）（参考文献 3）。

また、発声に伴う呼吸運動による肺迷走神経フィードバックの機能的役割も明らかとしてきた。発声運動中における肺迷走神経フィードバックは発声運動の周期を決定するのに重要な役割を果たしていることが明らかとなっている（図 8 C）（参考文献 13）。

聴覚フィードバック機構については、除脳標本においても Lombard reflex が存在することから、聴覚フィードバックが大腦皮質を介さずに、発声運動機構に影響を与えることが明らかとなっている（図 8 D）（参考文献 5）。

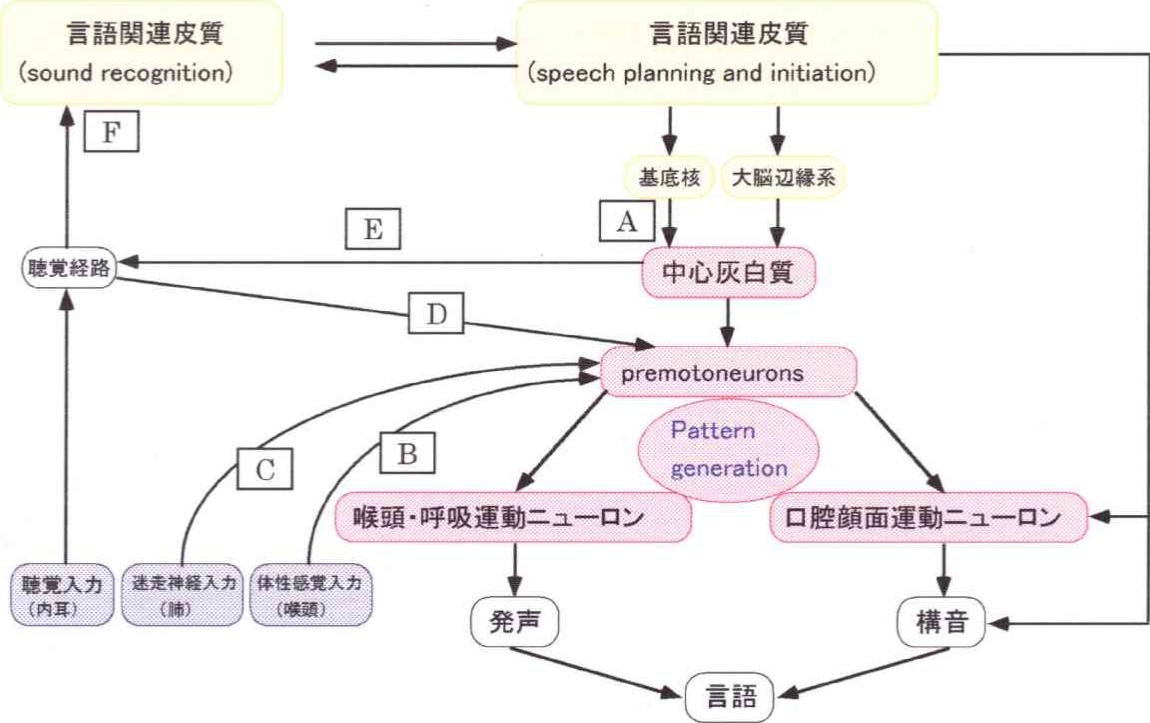


図 8 言語運動発現のための中枢神経機構の模式図（含フィードバック機構）

中脳中心灰白質からの運動司令が聴覚受容機構に対する影響を明らかにすること(図8E)で、これまで言われてきた聴覚障害による言語障害が大腦皮質のみを介する機構(図8F)だけではなく、脳幹レベルにおいても制御されていることが新たに明らかとなる。今後更に研究・解析が必要と思われる。

<参考文献>

1. Nonaka, S., Katada, A., Sakamoto, T. and Unno, T. Brain stem neural mechanisms for vocalization in decerebrate cats. (1999), *Ann. Oto. Rhino. Laryngol.* 108: 15-24.
2. 坂本尚志 生理的な実験を通してヒトの発声・発話のメカニズムを探る. (1999), *日本音響学会誌* 55: 783-788.
3. Shiba, K., Miura, T., Yuza, J., Sakamoto, T. and Nakajima, Y. Laryngeal afferent inputs during vocalization in the cat. (1999), *Neuroreport*, 10: 987-991.
4. Sakamoto, T., Katada, A., Nomura, M. and Nonaka, S. Differential projections from the periaqueductal gray (PAG) vocalization area to the medullary respiratory neurons in cats. (1997), *Abst. Soc. Neuro. Sci.* 22, p2083.
5. Nonaka S. Takahashi R. Enomoto K. Katada A. Unno T. Lombard reflex during PAG-induced vocalization in decerebrate cats. (1997), *Neuroscience Research*. 29(4):283-289, 1997
6. Sakamoto, T., Katada, A., Nonaka, S. and Takakusaki, K. Activities of expiratory neurons around the retrofacial nucleus during vocalization in decerebrate cats, *Neuroreport*, (1996) 7: 2353-2356.
7. Katada, A., Sugimoto, T., Utsumi, K., Nonaka, S. and Sakamoto, T. Functional role of ventral respiratory group expiratory neurons during vocalization. (1996), *Neuroscience Research*, 26: 225-233.
8. Sakamoto, T., Katada, A. and Nonaka, S. Control of Respiratory Muscles During Speech and Vocalization. (1996), *Neural Control of the Respiratory Muscles* (Eds. by A.D. Miller et al.), p 249-258.
9. Sakamoto, T., Katada, A., Sugimoto, T. and Kikuchi, K. Initiation of vocalization induced by disinhibition of the respiratory neurons in the nucleus of the solitary tract in cats. (1995), *Abst. Soc. Neuro. Sci.* 21, p1200.
10. 片田彰博、小林吉史、杉本俊彦、坂本尚志 (1995) 中心灰白質発声誘発部位からの下行性線維の解剖学的検討, *喉頭*, 8: p4-10.
11. Kobayashi, Y., Katada, A., Myoga, H. and Sakamoto, T. A PHA-L study on descending pathway for vocalization from the periaqueductal gray to the lower brainstem in cats. (1994), *Abst. Soc. Neuro. Sci.* 20, p1407.
12. 坂本尚志. 呼吸と発声(1994), *神経研究の進歩*, 38: p378-391.
13. Y. Yamanaka, T. Sakamoto, K. Wada, Y. Nakajima. Activities of the intralaryngeal muscles during electrically induced vocalization in decerebrate cats. (1993),

Neuroscience Research, 17:77-81.

14. T. Sakamoto , Y. Yamanaka, K. Wada, Y. Nakajima. Effects of tracheostomy on electrically induced vocalization in decerebrate cats. (1993), Neuroscience Letters, 158:92-96.

15. T. Sakamoto , K. Wada, Y. Yamanaka, Y. Nakajima. Effects of bicuculline microinjection into the periaqueductal gray upon electrically induced vocalization in decerebrate cats. (1993), Neuroscience Research, 18:235-240.