

学 位 論 文 の 要 旨

学位の種類	博士	氏名	國部 勇
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>The neuronal circuit of augmenting effects on intrinsic laryngeal muscle activities induced by nasal air-jet stimulation in decerebrate cats</p> <p>(鼻腔 air-jet 刺激による内喉頭筋活動増強現象の中樞神経機構)</p> <p>共著者名 野中 聡、片田彰博、安達正明、榎本啓一、原渕保明</p> <p>掲載雑誌名 Brain Research. 978: 83-90, 2003</p> <p>研究目的</p> <p>喉頭は、呼吸、発声、嚥下、気道反射など多様な機能を持つ。鼻腔に air-jet 刺激を加えると横隔膜の筋活動は減弱する一方で、声門閉鎖筋、開大筋ともに筋活動が持続的に増強する。本現象は鼻腔刺激により、主要呼吸筋と内喉頭筋の活動が乖離することを意味し、三叉神経より内喉頭筋運動ニューロンへの機能的接続の存在を示唆する。三叉神経の枝である前篩骨神経を切断すると、鼻腔 air-jet 刺激中の横隔膜と内喉頭筋の筋活動は変化しないことから、鼻腔 air-jet 刺激による求心性入力の前篩骨神経を経由して中枢へ送られると考えられる。一方、延髄には呼吸ニューロンが各所に存在し、呼吸に同期して活動している。これらのニューロンは、呼吸筋や内喉頭筋を支配する運動ニューロンの活動を直接的または間接的に制御する前運動ニューロンである。しかし過去の我々の成績では、鼻腔 air-jet 刺激に応じて活動を増強しかつ内喉頭筋運動ニューロンに促通性出力を送ることで、内喉頭筋活動の増強現象を誘発しうる活動様式を示した呼吸ニューロンは記録されなかった。このことは、三叉神経から内喉頭筋運動ニューロンへ延髄呼吸ニューロンを介さずに接続する経路が存在することを示唆する。しかし、実際にどのような神経細胞がこの現象の発現に関わっているのかは不明であった。他方、前初期遺伝子 <i>c-fos</i> の産生蛋白である Fos の免疫組織学的検討によって中枢神経内で活動を増強している神経細胞を同定する手法が近年確立されている。</p> <p>本研究は鼻腔 air-jet 刺激中の内喉頭筋活動増強現象に関わる神経回路を明らかにすることを目的とし、次にあげる二種類の実験を計画した。第一は免疫組織学的手法を用いて、鼻腔 air-jet 刺激中に Fos の発現を増強させる脳幹の神経細胞を同定し、三叉神経から内喉頭筋に至る神経回路を構成するニューロンを推測する実験である。第二は、推測されたニューロンが実際に三叉神経からの入力を受け、内喉頭筋運動ニューロンへ機能的に接続するかを電気生理学的手法を用いて明らかにする実験である。そのために気道反</p>			

射を保つ除脳ネコを用い、前篩骨神経から入力を受ける脳幹の神経細胞を同定し、鼻腔 air-jet 刺激中における活動動態を検討した。またスパイクトリガーアベレーシング法を用いて、これら同定されたニューロンの内喉頭筋に対する機能的な接続様式を検討した。

材料・方法

1、 鼻腔air-jet刺激による脳幹神経細胞のFos発現

実験にはSD成ラット10頭を用いた。ケタミン麻酔下に、鼻腔air-jet刺激の影響が上気道に及ばないように両側上喉頭神経を切断し、気管切開を施行した。右鼻腔に20℃、流量5 L/minのair-jet刺激を2時間加え、刺激終了後深麻酔下に灌流固定をおこない脳幹組織を摘出した。また同様の手術操作を行いair-jet刺激を加えない対照群を作成した。2日間の後固定ののち厚さ50 μmの前額断凍結連続切片を作成し、Fosの免疫染色を行った。光学顕微鏡下に鏡検し、ルンダ法にてFos陽性細胞をプロットし、各々の群のFos発現を比較検討した。

2、 鼻腔 air-jet 刺激中の脳幹ニューロンの活動動態

実験には、GOF 麻酔下に外科的に上位中枢を離断した無麻酔除脳ネコ7頭（体重2.1-3.7 kg）を用いた。喉頭反射の影響を除くため、両側の上喉頭神経を切断し気管切開を施行し、ネコを脳定位装置に固定した。手術終了後麻酔を停止し、1時間以上の間隔をあけてデータ記録を行った。筋活動は一对のステンレス線（径50 μm）を、声門閉鎖筋である甲状披裂筋および横隔膜に刺入し導出した。1の実験より推測された脳幹ニューロンの活動動態はタングステン微小電極（径10 μm）により記録した。刺激電極として前篩骨神経に一对のステンレス線（径50 μm）を装着した。前篩骨神経に単回電気刺激（持続0.2 msec）を加え順行性に応答する脳幹ニューロンを同定した。鼻腔 air-jet 刺激は流量10 L/minの空気を20℃に冷却し、内径2 mmの金属カテーテルを通して10秒間右鼻腔に加えた。

また同定された脳幹ニューロンの細胞外活動電位をトリガーとして内喉頭筋活動を記録するスパイクトリガーアベレーシング法を行い、活動を加算記録した。データ収集後に、実験に使用した脳幹ニューロンの位置を確認するために、記録電極を通じて直流通電（40 μA）を20秒間行なった。通電部位の確認は脳幹を摘出後に10%ホルマリンで固定し、50 μmの厚さで薄切後1%neutral redにて染色しておこなった。鼻腔刺激前後のニューロンの発射頻度および潜時の差は、Wilcoxon 順位和検定を用いて解析した。

成 績

1、 鼻腔 air-jet 刺激による脳幹神経細胞の Fos 発現

鼻腔 air-jet 刺激を加えたラットの脳幹神経細胞の Fos 発現を対照群のラットと比較した。その結果、前篩骨神経の投射部位である三叉神経脊髄路核以外に、孤束核、小細胞性網様体核に Fos の発現増強が認められた。Fos の発現は鼻腔刺激側で強く認められた。内喉頭筋運動ニューロンを制御する呼吸ニューロンは鼻腔 air-jet 刺激による内喉頭筋活動増強に関わらないという我々の過去の実験結果を考慮すると、小細胞性網様体核が鼻腔 air-jet 刺激による内喉頭筋活動増強現象の発現に関わっている可能性が推察された。

2、鼻腔 air-jet 刺激中の脳幹ニューロンの活動動態

1の結果より三叉神経からの入力を受け内喉頭筋運動ニューロンへ機能的に接続しているニューロンの候補として小細胞性網様体核ニューロンが考えられたため、これらのニューロンの鼻腔 air-jet 刺激時の活動動態を解析した。前篩骨神経電気刺激に順行性に応答するニューロンは、主に obex から 0-2.0 mm 吻側で正中から 2.0-4.5 mm 外側の小細胞性網様体核付近に分布していた。これらのニューロンの潜時は 2.55-9.05 ms (5.63 ± 1.57 ms; mean \pm S.D.) で、潜時のゆらぎはおよそ 2 ms 以内であった。これらのニューロンのうち、24% (17/71) のニューロンが鼻腔 air-jet 刺激により発射頻度の増大を認めた (刺激前: 40 ± 38.0 Hz、刺激中: 95 ± 58.6 Hz; $p=0.0003$)。ニューロンの発射は鼻腔刺激終了後すみやかに刺激前のレベルに戻った。一方で、76% (54/71) のニューロンが刺激中も変化を認めなかった (刺激前: 38 ± 30.6 Hz、刺激中: 43 ± 29.7 Hz; $p=0.3943$)。2群間で脳幹分布や潜時に有意な差を認めなかった。

3、スパイクトリガーアベレーシング法によるニューロンの内喉頭筋への機能的接続様式

鼻腔 air-jet 刺激中に発射活動を増大した小細胞性網様体核のニューロンをトリガー信号として、誘発された甲状披裂筋の筋活動を加算平均するスパイクトリガーアベレーシング法を行った。その結果、鼻腔 air-jet 刺激に応答する小細胞性網様体核ニューロンのうち 24% (4/17) において、約 12 ms の潜時で甲状披裂筋活動が誘発された。一方、残りの 76% (13/17) のニューロンでは甲状披裂筋活動に明らかな誘発電位を認めなかった。

考 案

免疫組織学的解析の結果より、鼻腔 air-jet 刺激を加えることで Fos の発現は三叉神経脊髄路核、孤束核、小細胞性網様体核において増強した。前篩骨神経は三叉神経脊髄路核へ投射することは明白であり、吸気ニューロンが存在する孤束核についても我々の過去の実験成績より、脳幹に存在する呼吸ニューロンは内喉頭筋活動の増強現象に寄与しないことは明らかである。したがって、鼻腔 air-jet 刺激による内喉頭筋活動増強現象の発現には小細胞性網様体核ニューロンが関与しているものと推測された。

前篩骨神経電気刺激に応答する小細胞性網様体核ニューロンのうち、24%が鼻腔 air-jet 刺激でも発射活動を増大させていた。このことから、これらの小細胞性網様体核ニューロンは鼻腔 air-jet 刺激による求心性入力を内喉頭筋運動ニューロンへ中継している可能性が示唆された。一方、残りの 74%のニューロンでは鼻腔 air-jet 刺激中に発射活動が増大しなかった。鼻腔 air-jet 刺激は鼻粘膜上に存在する flow receptor を介して中枢へ伝達されるが、これらの鼻腔 air-jet 刺激に応答しない小細胞性網様体核ニューロンは圧受容器など他の受容器から求心性入力を受けていると推測される。またスパイクトリガーアベレーシング法を用いることによって、鼻腔 air-jet 刺激に応答する小細胞性網様体核ニューロンのうち 26%が甲状披裂筋運動ニューロンに対して興奮性に接続することが確認された。この結果は、一部の小細胞性網様体核ニューロンは甲状披裂筋運動ニューロンに興奮性・乏シナプス性に投射し、鼻腔 air-jet 刺激中における内喉頭筋活動増強に役割を果たしていることを示唆するものであった。

一般的に小細胞性網様体核ニューロンには様々な感覚性入力が収束していることがよく知られている。喉頭が呼吸ニューロン以外に、小細胞性網様体核ニューロンのような多様な入力を受ける神経細胞からの投射も受けているという事実は、喉頭の多機能性を神経回路の面からも反映する結果であると考えられた。

結 論

1. 鼻腔 air-jet 刺激による内喉頭筋増強現象の神経回路を解明するため、鼻腔刺激による Fos 発現を解析した。得られた成績結果に基づき、鼻腔刺激中における小細胞性網様体核ニューロンの活動動態を解析した。また、このニューロンの内喉頭筋への機能的接続についても検討した。
2. 鼻腔刺激により Fos 発現が増強したのは、三叉神経脊髄路核、孤束核、小細胞性網様体核であり、本現象には小細胞性網様体核ニューロンが関与していると推測された。
3. 前篩骨神経電気刺激に応答する小細胞性網様体核ニューロンのうち、24%が鼻腔 air-jet 刺激でも発射頻度を増加させていた。さらにそのうちの 26%が甲状披裂筋運動ニューロンに対して興奮性に接続することが明らかとなった。
4. 鼻腔 air-jet 刺激により誘発される内喉頭筋活動の増強には、小細胞性網様体核ニューロンの一部が関与していることが示唆された。




引用文献

- 1) Enomoto K, Takahashi R, Katada A, Nonaka S. The augmentation of intrinsic laryngeal muscle activity by nasal air-jet stimulation of the nasal cavity in decerebrate cats. *Neurosci Res.* 31. 137-146. 1998
- 2) Nonaka S, Katada A, Nakajima K, Ohsaki T, Unno T. The effects of nasal flow stimulation on central respiration pattern. *Am J Rhinol.* 9. 203-208. 1995

参考論文

- 1) Katada A, Nonaka S, Kunibe I, Imada M, Hayashi T, Harabuchi Y. Restoration of function in the paralyzed laryngeal muscles by functional electrical stimulation in cats. *International Congress Series.* 1240. 839-842. 2003
- 2) 野中聡, 安達正明, 国部勇, 片田彰博, 今田正信, 原淵保明. 鼻腔抵抗値と Visual analogue scale により評価した鼻閉感、*日鼻誌* 42. 99-105. 2003
- 3) 片田彰博, 野中聡, 国部勇, 安達正明, 執行寛, 今田正信, 林達哉, 原淵保明. 脱神経後の内喉頭筋萎縮に対する機能的電気刺激の効果、*気食* 54. 270-276、2003
- 4) 国部勇, 野中聡, 片田彰博, 東松琢郎, 熊井恵美, 原淵保明. シラカンバ花粉症患者における咽喉頭症状. *喉頭* 15. 28-34. 2003
- 5) 国部勇, 浅野目充, 野中聡, 海野徳二. 蒸気吸入療法の加湿能 -モデル実験による解析-, *耳展* 38 (補2) . 97-101、1995

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士 (医学)	氏 名	国部 勇
<p>審査委員長 <u>坂平尚克</u> </p> <p>審査委員 <u>桐柳 誠</u> </p> <p>審査委員 <u>原渕保明</u> </p>			
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>The neuronal circuit of augmenting effects on intrinsic laryngeal muscle activities induced by nasal air-jet stimulation in decerebrate cats (鼻腔 air-jet 刺激による内喉頭筋活動増強現象の中樞神経機構)</p>			
<p>内喉頭筋は、呼吸運動に伴ってその活動が変化するが、呼吸運動のみならず、発声・嚥下・気道反射など多様な運動においても、その活動が変化する。本研究では、鼻腔からの感覚入力を例にとり、電気生理学的手法を用いて、このような多様な喉頭運動を制御する中枢神経機構を、動物モデルを用いて解析しようと試みた論文である。</p> <p>実験には、無麻酔除脳ネコを用い、鼻腔からの感覚入力には air-jet 刺激を用い、興奮性入力を受けている中枢神経系内の単一神経細胞活動を指標として、中枢神経機構を解析している。さらに、入力を受けている単一神経細胞から内喉頭筋への興奮性出力を、スパイクトリガー法を用いて確認している。</p> <p>得られた結果は明快で、鼻腔 air-jet 刺激により活動増強する神経細胞が、延髄小細胞性網様核に存在すること、またその細胞の中に、内喉頭筋へ興奮性</p>			

出力を送っている細胞が存在することが明らかとなった。このことは、鼻腔 air-jet 刺激による三叉神経由来の情報が小細胞性網様核ニューロンを介して内喉頭筋運動ニューロンに伝達されることを明確に示している。

小細胞性網様核は、咽頭、喉頭粘膜および上位発声中枢からの入力を受け、嚥下、咳、発声など喉頭の多様な運動出力を形成する前運動ニューロン群が存在する部位であることが報告されている。本研究は、鼻腔粘膜からの入力もこのニューロン群を介して、喉頭の運動制御に関与することを初めて明らかにしたもので、今後喉頭運動制御機構の研究の進歩に資するところが大きいと思われる。本論文は既に 2003 年の Brain Research 誌に掲載済みである。

なお、論文提出者に対する本論文の内容、関連領域に関する試問に対し、適切な回答が得られ、学力も十分と考えられた。以上より、本論文は博士の学位論文に値すると判定された。