

学 位 論 文 の 要 旨

学位の種類	博士	氏名	安達 正明
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>Carbachol injection into the pontine reticular formation depresses laryngeal muscle activities and airway reflexes in decerebrate cats</p> <p>(除脳ネコ脳幹網様体へのカルバコール注入による喉頭筋活動および気道反射の抑制)</p> <p>共著者名 野中 聡、片田彰博、荒川卓哉、太田 亮、原田広文、高草木 薫、原渕保明</p> <p>掲載雑誌名 Neuroscience Research</p> <p>研究目的</p> <p>鼻や口から吸い込まれた外気が気管を経由して肺に到達するまでには、必ず咽頭および喉頭を通過しなければならない。咽頭、喉頭を構成する上気道筋群は、嚥下反射、くしゃみや咳反射などの上気道反射の形成に重要な役割を果たしている。上気道筋群の運動ニューロンは延髄腹側に存在し、種々の上位中枢から投射を受けている。その中には睡眠や覚醒を制御する部位からの投射も含まれている。従って、睡眠中の閉塞型無呼吸や、気道防御反射の低下による誤嚥の発現には、睡眠・覚醒サイクルに伴う上気道筋群の筋活動の変化が関与していると推察される。</p> <p>脳幹の橋に存在する内側橋網様体(medial pontine reticular formation: mPRF)のコリン受容性ニューロンは、睡眠・覚醒サイクルの形成に関与すると同時に、呼吸筋や上気道筋群の運動ニューロン活動を変化させることがわかっている。また、コリン作動薬であるカルバコールを無麻酔ネコの mPRF へ微量注入すると、REM 睡眠様状態が誘発され、呼吸サイクルが延長すること、さらに mPRF のコリン受容性ニューロンの活動が上気道筋群運動ニューロンの活動を抑制することなどが確認されている。しかし、mPRF のコリン受容性ニューロンの活動がくしゃみ、咳反射、嚥下反射などの上気道反射の発現にどのような役割をはたしているかは、ほとんど議論されていない。</p> <p>したがって、本研究では、mPRF のコリン受容性ニューロンの活動が、呼吸筋活動と同様に、嚥下反射、くしゃみ、咳反射のような上気道反射を抑制するという仮説を検証することを目的とした。そのために、カルバコールの注入によって mPRF のコリン受容性ニューロンを賦活させたときの、それぞれの反射の発現頻度や筋活動の大きさが時間的および空間的にどのように変化していくのか詳細に検討した。</p>			

材料・方法

1. 動物モデルの作成

実験には中脳より上位中枢を外科的に離断した除脳ネコ17頭（体重2.0-3.5 kg）を用いた。除脳を含む手術操作はハロセンガス麻酔下におこなった。喉頭反射、咳反射、嚥下反射を誘発するために、左上喉頭神経に一对のワイヤー電極を固定した。また、くしゃみ反射を誘発するために、左前篩骨神経にワイヤー電極を同様に固定した。手術終了後、ネコを脳定位固定装置に固定した。除脳ネコが自発呼吸を保つことを確認し、体温、血圧、経皮的酸素飽和度、呼気終末二酸化炭素濃度をモニターしながら実験をおこなった。麻酔薬の上気道反射に対する影響を除外するために、麻酔終了から1時間経過したのち、記録を開始した。

2. カルバコールの微量注入

カルバコールを微量注入する内側橋網様体(mPRF)の位置を確認するために、タングステン微小電極を脳定位固定装置上のHorsley-Clark座標に従って脳幹に刺入し、電気刺激による呼吸周期の延長や呼吸筋活動の減弱を確認した。電気刺激により確認されたmPRFに4.0 μ gのカルバコール(0.25 μ l)を、ハミルトンマイクロシリンジを用いて20-60秒の時間をかけ、持続的に注入した。

3. 筋活動の測定

筋活動は、声門閉鎖筋である甲状被裂筋(TA)、声門開大筋である後輪状被裂筋(PCA)、横隔膜(DIA)、おとがい舌筋(GG)、背側頸筋(Neck)に一对のステンレスワイヤー電極を刺入し導出した。また、眼球運動は両眼角の骨に刺入したステンレススクリーから導出した。得られた筋活動はデジタルデータレコーダーに保存し、コンピュータ (Power Mac 7300/166) 上でオフライン解析した。声門下圧の変化は声門下にマイクロチップカテーテル圧トランスデューサを留置して記録した。

4. 上気道反射の誘発

喉頭反射は刺激頻度 2Hz、強度 5-60 μ A の上喉頭神経への電気刺激により誘発した。咳反射は上喉頭神経に喉頭反射閾値の 1.2 倍の強度の電気刺激を、頻度 30Hz で 10 秒間加えて誘発した、嚥下反射は咳反射誘発と同じ強度の刺激を頻度 10Hz で 30 秒間加えて誘発した。くしゃみ反射は前篩骨神経に頻度 10 Hz、強度 5-60 μ A、の電気刺激を 15 秒間加えて誘発した。

5. 注入部位の同定

データ収集後に、電氣的刺激部位確認のため、30 μ Aの直流電流を30秒間通電し標識した。カルバコール注入部位とその拡散を確認するため、0.25-0.5 μ lの10%のFast Greenを注入した。脳幹を摘出後10%ホルマリン固定し50 μ mの厚さの冠状脳幹連続切片を作成した。1%neutral red で切片を染色し通電した部位を光学顕微鏡で確認した。注入したFast Green染料の位置と範囲も同様に確認した。

6. 統計処理

統計学的な解析は、Mann-Whitney Uテスト(ノンパラメトリック検定)を用いた。

成 績

1. カルバコール注入による筋活動の抑制

安静呼吸時の呼吸筋および内喉頭筋の活動は、内側橋網様体(mPRF)へのカルバコール微量注入によって強く抑制された。内喉頭筋である TA の筋活動は注入前の 29.5%、PCA は 54.3%と有意に減少した。呼吸筋、および姿勢筋である DIA、GG、Neck の筋活動もそれぞれ注入前の 71.2%、44.6%、7.3%と有意に減少した。吸気に関与する PCA、DIA の抑制は、呼気に関与する TA、姿勢に関与する Neck よりも小さい傾向が認められた。注入による筋活動の抑制は時間経過とともに回復したが、PCA、DIA の抑制は、TA よりも速やかに回復する傾向があった。

2. カルバコール注入による喉頭反射の抑制

カルバコール注入後、喉頭反射の潜時は最大で 1.21 ms 延長し、反射の大きさは 55.6%に減少した。注入による喉頭反射の抑制は 2 時間 30 分持続し、その後回復した。

3. カルバコール注入による上気道反射の抑制

カルバコールの注入後 10 分から前筋骨神経刺激によるくしゃみ反射の発現が抑制され、4 頭中 3 頭で発現頻度が 20%以下に減少した。その抑制効果は 60 分以上持続した。上喉頭神経刺激による咳反射も同様に抑制され 4 頭すべての動物で発現頻度が 30%以下に減少した。注入による咳反射の抑制効果はおよそ 2 時間持続した。上喉頭神経刺激による嚥下反射の頻度は、4 頭すべての動物で 40%未満に減少した。注入による抑制効果は 2 時間以上持続した。経時的な変化では注入後 40 分から 80 分の間で各反射に対する最も強い抑制効果が観察された。また、くしゃみ反射への抑制効果は咳反射や嚥下反射と比較して発現が最も遅く、抑制持続時間も短い傾向が認められた。

4. 注入部位の組織学的検討

カルバコール注入部位は、すべての動物で橋網様体の背側および背内側部に位置し、解剖学的には吻側橋網様核に対応していた。

考 案

本研究の結果から、コリン作動薬であるカルバコールの内側橋網様体(mPRF)への注入は安静呼吸時の呼吸筋活動や内喉頭筋活動を抑制した。また、カルバコール注入による筋活動抑制効果には、筋による違いが認められた。呼吸筋や上気道筋群のなかでも特に吸気に関連する横隔膜や声門開大筋では筋活動の抑制が小さく、呼気に関連する声門閉鎖筋や姿勢維持に関連する背側頸筋に対する抑制が大きい傾向がみとめられた。吸気は呼吸調節の能動的過程であり、吸気筋の抑制が小さいことは、REM 睡眠中の呼吸運動の維持に有益であると推測された。

また、mPRF へのカルバコール注入は喉頭反射、くしゃみ、咳反射、嚥下反射の発現を抑制した。今回検討した上気道反射のなかでは、前筋骨神経由来のくしゃみ反射のほうが、上喉頭神経由来の咳反射や嚥下反射よりも、注入による抑制効果が小さいことが確認された。mPRF のコリン受容性ニューロンの賦活による上気道反射の抑制は、単純な上気道筋群運動ニューロンへの抑制ではなく、反射神経回路のさまざまなレベルに影響を及ぼしている可能性が推察された。

mPRF へのカルバコールの注入は、REM 睡眠様状態を誘発することが知られている。従って、通常の REM 睡眠中においても、呼吸運動の抑制と同時に上気道反射の発現が抑制されている可能性が考えられる。もし、睡眠中に喉頭反射やくしゃみ、咳反射、嚥下反射の発現が異常に亢進するようなことがあれば、過剰な声門閉鎖による窒息を生じたり、頻回な嚥下運動、咳嗽反射によって睡眠が分断され、睡眠の質が著しく障害されることになる。したがって、睡眠中に上気道反射の発現が抑制されることは有益であると考えられる。しかし逆に、上気道筋群の活動低下や上気道反射の抑制が過剰におこれば、閉塞型の睡眠時無呼吸が誘発されたり、誤って気道へ進入した唾液や異物を喀出できず、不顕性誤嚥を引き起こすことになる。睡眠中の mPRF コリン受容性ニューロンの不適当な活動が、中途覚醒、睡眠時無呼吸、睡眠中の誤嚥などの睡眠障害の発現に関与している可能性が示唆された。

結 論

1. 内側橋網様体(mPRF)のコリン受容性ニューロンの活動亢進が、呼吸筋活動を抑制するのと同様に、嚥下反射、くしゃみ、咳反射のような上気道反射を抑制するという仮説を検証した。
2. 無麻酔除脳ネコを動物モデルとし、コリン作動薬であるカルバコールを mPRF へ微量注入したときの、安静時呼吸筋活動の変化、喉頭反射、くしゃみ、咳反射、嚥下反射の変化について解析した。
3. mPRF へのカルバコールの微量注入によって、安静呼吸時の呼吸筋活動および上気道筋群の活動が抑制された。筋活動の抑制は吸気運動に関連する筋では小さく、呼気運動や姿勢維持に関与する筋では大きい傾向がみられた。
4. カルバコールの微量注入によって喉頭反射、くしゃみ、咳反射、嚥下反射の発現が抑制された。抑制効果は、前篩骨神経由来のくしゃみにおいては小さく、上喉頭神経由来の咳反射や嚥下反射では大きい傾向がみられた。
5. 注入部位はすべて橋網様体の背側および背内側に位置し、解剖学的には吻側橋網様核に対応していた。
6. mPRF のコリン受容性ニューロン活動の異常亢進が睡眠中の閉塞性無呼吸や誤嚥の発生に関与している可能性が示唆された。




引用文献

- 1) Takakusaki, K., Saitoh, K., Nonaka, S., Okumura, T., Miyokawa, N., Koyama, Y. Neurobiological basis of state-dependent control of motor behavior. *Sleep Biol. Rhyth.* 4, 87-104. 2006
- 2) Nonaka, S., Unno, T., Ohta, Y., Mori, S. Sneezing-evoking region within the brainstem. *Brain Res.* 511, 265-270. 1990
- 3) Kubin, L., Kimura, H., Tojima, H., Pack, A.I., Davies, R.O. Behavior of VRG neurons during the atonia of REM sleep induced by pontine carbachol in decerebrate cats. *Brain Res.* 592, 91-100. 1992

参考論文

- 1) Kumibe I, Nonaka S, Katada A, Adachi M, Arakawa T, Harabuchi Y. Fos expression in the brainstem nuclei evoked by nasal air-jet stimulation in rats. *Am J Rhinol.* 2007 Jan-Feb;21(1):128-32.
- 2) Katada A, Nonaka S, Adachi M, Kumibe I, Arakawa T, Imada M, Hayashi T, Zealear DL, Harabuchi Y. Functional electrical stimulation of laryngeal adductor muscle restores mobility of vocal fold and improves voice sounds in cats with unilateral laryngeal paralysis. *Neurosci Res.* 2004 Oct;50(2):153-9.
- 3) Kumibe I, Nonaka S, Katada A, Adachi M, Enomoto K, Harabuchi Y. The neuronal circuit of augmenting effects on intrinsic laryngeal muscle activities induced by nasal air-jet stimulation in decerebrate cats. *Brain Res.* 2003 Jul 18;978(1-2):83-90.

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	安達 正明
<p>審査委員長 <u>坂本尚志</u> </p> <p>審査委員 <u>銀田泰輔</u> </p> <p>審査委員 <u>千尋 茂</u> </p>			
<p>学 位 論 文 題 目</p>			
<p>Carbachol injection into the pontine reticular formation depresses laryngeal muscle activities and airway reflexes in decerebrate cats. (除脳ネコ脳幹網様体へのカルバコール注入による喉頭筋活動および気道反射の抑制)</p>			
<p>睡眠中の閉塞型無呼吸や誤嚥の発生には、上気道筋群の筋活動の変化が関与していることが推測されている。睡眠・覚醒サイクルの形成に関与する内側橋網様体のコリン受容性ニューロンは、睡眠・覚醒サイクルの形成に関与すると同時に、呼吸筋や上気道筋群の運動ニューロン活動を抑制していることが明らかとなっている。本研究は、内側橋網様体のコリン受容性ニューロンが、上気道反射を抑制しているかを、動物モデルにおいて電気生理学的手法を用いて解析しようと試みた研究である。</p> <p>実験には、無麻酔除脳ネコを用い、内側橋網様体のコリン受容性ニューロンの活動をコリン作動物質であるカルバコールの微小注入により制御し、上気道反射として、上喉頭神経刺激により誘発される喉頭反射、嚥下反射、咳反射、</p>			

および前篩骨神経刺激により誘発されるくしゃみ反射を用い、喉頭反射の潜時、大きさ、および嚥下・咳、くしゃみ反射の発現頻度を指標として、解析している。

得られた結果は明快で、カルバコール注入により、喉頭反射の潜時が延長し、大きさが減少すること、また嚥下・咳・くしゃみ反射の発現頻度が減少することが明らかとなった。喉頭反射の潜時が延長し、その大きさが減少していることは、橋内側網様体のコリン受容性ニューロンが、上喉頭筋群運動ニューロンのみならず、介在ニューロンの活動を抑制していることを示唆している。

本研究は、内側橋網様体のコリン作動性ニューロンが、嚥下、咳、くしゃみなど喉頭の多様な運動出力を形成する介在ニューロン群の活動に対して影響を与えていることを初めて示唆するもので、今後喉頭運動制御機構のみならず睡眠中の閉塞型無呼吸や誤嚥など臨床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2010年のNeuroscience 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（医学）の学位論文に値すると判定された。