

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：32622

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15687

研究課題名(和文) 動脈灌流標本を用いた舌根沈下の中樞メカニズムの解明

研究課題名(英文) Analysis of neuronal mechanisms underlying glossoptosis using arterially perfused decerebrate rats

研究代表者

井上 富雄 (INOUE, TOMIO)

昭和大学・歯学部・教授

研究者番号：70184760

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：舌根沈下は、閉塞性睡眠時無呼吸症候群などのさまざまな換気障害を引き起こすリスク要因であるが、その成因の詳細は未だ不明である。そこでラット動脈灌流標本を用いて高炭酸ガス負荷時の舌筋を含む上気道筋の活動を解析した。その結果、高炭酸ガス負荷によって記録したすべての上気道筋運動神経で前吸息相に活動が出現し、その振幅が増大した。また上気道筋の前吸息相の活動は、強制呼気の指標である腹直筋活動と関連した。高炭酸ガス負荷におけるこのような上気道筋群の活動は、声門開大前に気道を十分拡張させて換気を促進すると考えられる。舌根沈下は、これらの調節メカニズムが何らかの原因でうまく機能しなくなったものと推察される。

研究成果の概要(英文)：Glossoptosis may cause obstructive ventilatory defects, such as obstructive sleep apnea syndrome; however, its etiology is not clear. In this study, we analyzed effects of hypercapnic acidosis on the respiratory motor nerve activity innervating the upper airway muscles using arterially perfused decerebrate rats. During hypercapnic acidosis (8% CO₂), the peak amplitudes of the inspiratory discharges in the cervical spinal nerve innervating the infrahyoid muscles (CN), the hypoglossal nerve (HGN), the external branch of the superior laryngeal nerve (SLN), and the recurrent laryngeal nerve (RLN) were increased. Moreover, hypercapnic acidosis induced pre-inspiratory discharges in the CN, HGN, SLN, and RLN. These results suggest that the securing of the airway that occurs a certain time before dilation of the glottis may facilitate ventilation and improve hypercapnic acidosis. Glossoptosis may occur due to some defects of such regulation of upper airway muscle activity.

研究分野：吸嚥、咀嚼、嚥下を中心とした摂食行動の神経生理

キーワード：舌筋 呼吸 動脈灌流標本 上気道開大筋 二酸化炭素負荷

1. 研究開始当初の背景

睡眠時に舌根が沈下すると気道閉塞が起こり、閉塞性睡眠時無呼吸症候群の発症の原因の一つとなる。睡眠時無呼吸症候群は、日中の眠気、疲労感、判断力の低下等を起こしたり、生活習慣病の引き金にもなりうる。また、全身麻酔導入時に舌根沈下が起きると、吸気による陰圧で舌根が上気道に吸引され、最悪の場合は気道閉塞が高度に起こって換気不能、挿管不能に陥り、重篤な結果をもたらす。さらに、重度心身障害児で、障害の種類によって舌根沈下が起こり、気道閉塞による換気障害が起きる危険性がある。オトガイ舌筋やオトガイ舌骨筋の緊張低下が舌根沈下につながることを示唆されているが (Herder et al. BMJ, 2004)、これらの筋の緊張を低下させる中枢メカニズムは未だ不明である。

麻酔薬、鎮静薬、麻薬性鎮痛薬などの投与で舌根沈下を実験的に誘発できる可能性があるが、これらの薬物は同時に呼吸中枢や循環中枢を抑制する。そうすると動物の全身状態が変化し、舌根沈下をもたらす中枢機構に対する実験操作の影響を切り分けて解析することができない。そこで、ラットに心臓移植時に行われる体外循環法を適用して人工脳脊髄液を循環させ、標本自体の呼吸・循環機能に脳循環が影響を受けない“動脈灌流標本”を作製し、舌根沈下に特異的に関与する中枢機構の解明を目指し本研究を行った。

2. 研究の目的

全身麻酔導入時に舌根沈下が起き換気不能、挿管不能になる事例を参考に各種の麻酔薬、鎮静薬、麻薬性鎮痛薬などを投与し、呼吸リズムに対する影響を解析し舌根沈下の実験モデルを作成する。次に人工脳脊髄液の二酸化炭素濃度を変化させることで、舌筋運動神経活動を含めた種々の上気道筋の運動神経活動を記録し、気道の確保に関する反応を解析し、舌根沈下を含めた上気道閉塞のメカニズムの解明につなげる。

3. 研究の方法

実験

生後3-4週齢のWistarラットを用いて、イソフルレン麻酔下にて横隔膜直下で下半身を離断し、上丘の前端で除脳を行い、下行大動脈の断端からカテーテルを挿入し、送液ポンプを用いて人工脳脊髄液を灌流し、除脳ラット灌流標本を作製した。頸神経、舌下神経、反回神経の活動を、横隔神経の活動と同時に吸引電極を用いて記録した。麻酔薬であるソムノペンチルもしくはプロポフォールや鎮静薬であるデクスメデトミジンを灌流液中へ投与し、その効果を調べた。

動脈灌流に用いる人工脳脊髄液の組成 (mM) は、125 NaCl, 3 KCl, 24 NaHCO₃, 1.25 KH₂PO₄, 1.25 MgSO₄, 2.5 CaCl₂, 10 dextrose で、さらに1.25% Ficoll (Sigma, St. Louis,

MO)とヘパリン (10 unit/mL)を混入した。

実験

実験 と同様の動脈灌流標本を用いて、舌下神経活動のほかに、舌骨下筋を支配する第1-2頸神経、声門内転筋および外転筋を支配する反回神経、下咽頭収縮筋を支配する上喉頭神経、腹直筋運動神経の活動を横隔神経の活動と同時に記録した。高炭酸ガス負荷時には92% O₂-8% CO₂混合ガスで灌流液を飽和させたものを15分灌流して評価を行った。

4. 研究成果

実験

ソムノペンチルおよびプロポフォールは、濃度依存性に吸息活動の振幅を減弱させ、呼吸頻度を低下させた。ソムノペンチル (50 µg/ml)、プロポフォール (40 µg/ml) の投与で呼吸は完全に消失した。このような麻酔薬による吸息活動の振幅の減弱は、舌下神経において、横隔神経よりも低濃度で起こっていた。一方、反回神経の活動の減弱は、他の神経に比べて起こりにくかった。デクスメデトジンは呼吸抑制を起こしにくいことが知られているが、20 µg/ml の投与で呼吸が完全に消失した。以上の結果から、麻酔薬や鎮静薬は呼吸抑制を起こすが、舌筋を支配する舌下神経の活動は、他の呼吸に関係する神経の活動よりも麻酔薬の影響を受けやすいことが示唆された。

実験

92% O₂-8% CO₂混合ガス曝気によって灌流液中のCO₂濃度を、pHが7.2になるまで上昇させ高炭酸ガス負荷を行い、活動電位に対する影響を調べた (n = 5)。その結果、呼吸頻度は15.1 ± 9.5%低下したが、吸息に一致した横隔神経、上喉頭神経、舌下神経および第1-2頸神経活動の振幅は、それぞれ140 ± 8.7%、111.2 ± 3.15%、141.6 ± 14.5%、139.5 ± 8.74%に増大した。さらに、第1-2頸神経活動の開始から横隔神経活動の開始までの時間は、CO₂濃度の上昇により有意に延長した(コントロール: 0.28 ± 0.03秒、CO₂濃度上昇: 0.83 ± 0.04秒、n = 5)。舌下神経、上喉頭神経でも同様の結果が得られた(コントロール: 0.21 ± 0.06秒、CO₂濃度上昇: 0.66 ± 0.10秒、n = 5)(コントロール: 0.18 ± 0.05秒、CO₂濃度上昇: 0.81 ± 0.02秒、n = 5)。また、肋間筋神経活動は高炭酸ガス負荷による強制呼気によって前吸息相の活動が著しく増大し、上気道筋の前吸息相の活動は、第1-2頸神経と良く相関したが、コントロール時では相関が認められなかった(高炭酸ガス負荷: r = 0.63, コントロール: r = -0.31, n = 6)。また、強制呼気時に活動が出現する腹直筋の活動も解析したところ、高炭酸ガス負荷の開始後、腹直筋活動の出現とともに第1-2頸神経の活動の上昇が始まり、両者の有意な相関が認

められた ($r = 0.53$, $n = 6$).

以上の結果から、生後 3-4 週齢の除脳ラット灌流標本において、CO₂ 濃度の上昇により中枢の化学受容野が刺激され、呼吸数の変動や神経活動の振幅の増大を引き起こすことが示された。また頸部の筋肉および舌根部の筋、舌骨下筋群の活動開始と横隔膜の活動開始時間のずれが大きくなることが示唆された。このような変化は、高 CO₂ 濃度負荷時の呼吸パターンの変化に対応し、声門開大前に気道を十分拡張させて換気を促進すると考えられる。舌根沈下は、これらの調節メカニズムが何らかの原因でうまく機能しなくなったものと推察される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 9 件)

- 1) Inoue T, Nakayama K, Ihara Y, Tachikawa S, Nakamura S, Mochizuki A, Takahashi K, Iijima T. Coordinated control of the tongue during suckling-like activity and respiration. *J Oral Science*, 査読有, in press.
- 2) Matsuda K, Nakamura S, Nonaka M, Mochizuki A, Nakayama K, Iijima T, Yokoyama A, Funahashi M, Inoue T. Premotoneuronal inputs to early developing trigeminal motoneurons. *Journal of Oral Biosciences*, 査読有, in press.
- 3) Saito E, Suzuki D, Kurotaki D, Mochizuki A, Manome Y, Suzawa T, Toyoshima Y, Ichikawa T, Funatsu T, Inoue T, Takami M, Tamura T, Inagaki K, and Kamijo R. Down-regulation of Irf8 by Lyz2-cre/loxP accelerates osteoclast differentiation in vitro. *Cytotechnology*, 査読有, in press.
- 4) Tachikawa S, Nakayama K, Nakamura S, Mochizuki A, Iijima T, Inoue T. Coordinated respiratory motor activity in nerves innervating the upper airway muscles in rats. *PLoS One*, 査読有, 2016 Nov 10;11(11):e0166436.
- 5) Nagata S, Nakamura S, Nakayama K, Mochizuki A, Yamamoto M, Inoue T. Postnatal changes in glutamatergic inputs of jaw-closing motoneuron dendrites. *Brain Res Bull*, 査読有, 127, 47-55, 2016.
- 6) Ikawa Y, Mochizuki A, Katayama K, Kato T, Ikeda M, Abe Y, Nakamura S, Nakayama K, Wakabayashi N, Baba K, Inoue T. Effects of citalopram on jaw-closing muscle activity during sleep and wakefulness in mice. *Neurosci Res*, 査読有, 2016; 113:48-55.
- 7) Konno A, Nishimura A, Nakamura S, Mochizuki A, Yamada A, Kamijo R, Inoue T, Iijima T. Continuous monitoring of caspase-3 activation induced by propofol in developing mouse brain, *Int J Dev Neurosci*, 査読有, 2016; 51:42-49.
- 8) Kiyomoto M, Shinoda M, Honda K, Nakaya Y,

Dezawa K, Katagiri A, Kamakura S, Inoue T, Iwata K. p38 phosphorylation in medullary microglia mediates ectopic orofacial inflammatory pain in rats. *Mol Pain*. 査読有, 2015 Aug 12;11:48.

9) Katayama K, Mochizuki A, Kato T, Ikeda M, Nogawa Y, Nakamura S, Nakayama K, Wakabayashi N, Baba K, Inoue T. Dark/light transition and vigilance states modulate jaw-closing muscle activity level in mice. *Neurosci Res*, 査読有, 101: 24-31, 2015.

[学会発表](計 3 2 件)

- 1) Mochizuki A, Katayama K, Kato T, Ikawa Y. *et al.*: The effects of dark/light transition and sleep-wake cycles on jaw-closing masseter muscle activity level in mice. 5th Annual International Institute for Integrative Sleep Medicine (IIIS) Symposium, 2016/12/12, Shinagawa.
- 2) Dantsuji M, Nakamura S, Mochizuki A, Nakayama K, *et al.*: Serotonin modulates NMDA receptor-mediated glutamate responses through 5-HT_{2A} receptors in dendrites of rat jaw-closing motoneurons. Society for Neuroscience 46th annual meeting, 2016/11/15, San Diego, U.S.A.
- 3) 永田愛, 中山希世美, 山口徹太郎, 横宏太郎, 井上富雄: 咬筋運動ニューロンのシナプス入力 of セロトニンによる調節. 第75回日本矯正歯科学会大会, 2016/11/7-9, 徳島.
- 4) 井上富雄: マウス咬筋活動に対するシタロプラムの効果. 日本咀嚼学会第27回学術大会, 2016/11/5, 広島.
- 5) 中村史朗, 望月文子, 中山希世美, 井上富雄: 三叉神経運動ニューロンへのグルタミン酸性シナプス伝達機構の生後変化. 日本顎口腔機能学会第57回学術大会, 2016/10/1, 仙台.
- 6) 那小屋公太, 中村史朗, 中山希世美, 望月文子, 井上富雄: ラット三叉神経運動核背側領域に存在するPhox2b陽性ニューロンの電気生理学的特性. 第58回歯科基礎医学会学術大会, 2016/8/26, 札幌.
- 7) 井川泰葉, 望月文子, 加藤隆史, 片山慶祐他: ノンレム睡眠時の咬筋活動に対するシタロプラムの作用. 第58回歯科基礎医学会学術大会 J. Oral Biosci. Suppl. 513, 2016, 2016/8/26, 札幌.
- 8) 中村史朗, 中山希世美, 望月文子, 清本聖文, 井上富雄: 発達期ラット三叉神経運動ニューロンへのグルタミン酸性シナプス入力. 第58回歯科基礎医学会学術大会 J. Oral Biosci. Suppl. 507, 2016, 2016/8/26, 札幌.
- 9) 壇辻昌典, 中村史朗, 望月文子, 中山希世美他: セロトニンは 5-HT_{2A}受容体を介して NMDA 受容体機能を調節し咬筋運動ニューロンのグルタミン酸応答を増大する. 第58回歯科基礎医学会学術大会, 2016/8/25, 新潟.
- 10) 井上富雄, 中村史朗, 中山希世美, 望月

文子: 覚醒制御に関わる脳内生理活性物質の三叉神経中脳路核ニューロンおよび閉口筋運動ニューロンに対する影響. 第58回歯科基礎医学会学術大会 サテライトシンポジウム15, J. Oral Biosci. Suppl. 159, 2016, 2016/8/24, 札幌.

11) 壇辻昌典, 中村史朗, 中山希世美, 望月文子他: Serotonergic modulation of NMDA receptor-mediated glutamate responses in the dendrites of rat jaw-closing motoneurons. 第39回日本神経科学大会, 2016/7/21, 横浜.

12) 那小屋公太, 中村史朗, 中山希世美, 望月文子他: ラット三叉神経運動核背側領域に存在するPhox2b陽性ニューロンの電気生理学的特性. 第330回昭和学士会例会, 2016/6/25, 東京.

13) 壇辻昌典, 中村史朗, 中山希世美, 望月文子他: 咬筋運動ニューロン樹状突起のグルタミン酸応答に対するセロトニンの効果. 第330回昭和学士会例会, 2016/6/25, 東京.

14) Nakayama K, Mochizuki A, Nakamura S, Inoue T.: Inhibition of neuronal activities in mesencephalic trigeminal sensory neurons via orexin receptor-2 in rats. 17th international symposium of olfaction and taste, 2016/6/7, 横浜.

15) 望月文子, 井川泰葉, 加藤隆史, 片山慶祐他: シタロプラムはノンレム睡眠時の咬筋活動を変調させる. 日本顎口腔機能学会第56回学術大会, 2016/4/23, 埼玉.

16) 立川哲史, 中山希世美, 望月文子, 中村史朗他: 経動脈灌流標本を用いた上気道及び喉頭筋を支配する神経の呼吸性活動におけるアシドーシスの影響. 第93回日本生理学会大会, 2016/3/24, 札幌.

17) Nakamura S, Nagata S, Nakayama K, Mochizuki A, *et al.*: Developmental changes of glutamatergic synaptic properties in rat jaw-closing motoneurons. The 93rd annual meeting of the physiological society of Japan, Symposium 24, J Physiol Sci. Supplement 1: S57, 2016, 2016/3/22, Sapporo.

18) 中山希世美, 玄番千夏子, 望月文子, 中村史朗, 井上富雄: ヒスタミンによるラット閉口反射の抑制. 日本顎口腔機能学会第55回学術大会, 2015/11/1, 大阪.

19) Nakayama K, Gemba C, Nakamura S, Mochizuki A, *et al.*: Presynaptic histaminergic inhibition of synaptic transmission from mesencephalic trigeminal afferents to masseter motoneurons in juvenile rats. Society for Neuroscience 45th annual meeting, 2015/10/20, Chicago, U.S.A.

20) Tachikawa S, Nakayama K, Mochizuki A, Nakamura S, *et al.*: Effects of hypercapnia on respiratory motor activity in nerves innervating the neck and tongue muscles.

Society for Neuroscience 45th annual meeting, 2015/10/19, Chicago, U.S.A.

21) Nogawa Y, Mochizuki A, Katayama K, Ikeda M, *et al.*: The effects of citalopram on masseter and neck muscle activities in mice. Society for Neuroscience 2015 Annual Meeting, 2015/10/18, Chicago, U.S.A.

22) Nakamura S, Nagata S, Nakayama K, Mochizuki A, *et al.*: Developmental changes of dendritic properties in rat jaw-closing motoneurons. NANOSYMPOSIUM; Oral motor and speech, Society for Neuroscience 45th annual meeting, 2015/10/17, Chicago, U.S.A.

23) 中村史朗, 梶原里紗, 望月文子, 中山希世美他: 咬筋運動ニューロンへの興奮性シナプス伝達の生後発達. 第57回歯科基礎医学会学術大会, 2015/9/13, 新潟.

24) 玄番千夏子, 中山希世美, 望月文子, 中村史朗他: ヒスタミンはシナプス前H1受容体を介して三叉神経中脳路核から咬筋運動ニューロンへの入力を抑制する. 第57回歯科基礎医学会学術大会, 2015/9/13, 新潟.

25) 立川哲史, 中山希世美, 望月文子, 中村史朗他: 除脳ラット灌流標本を用いた上気道筋群の支配神経活動へのCO2負荷の影響. 第57回歯科基礎医学会学術大会, 2015/9/12, 新潟.

26) 壇辻昌典, 中村史朗, 中山希世美, 望月文子他: 咬筋運動ニューロン樹状突起のグルタミン酸応答に対するセロトニンの効果. 第57回歯科基礎医学会学術大会, 2015/9/12, 新潟.

27) 野川泰葉, 望月文子, 片山慶祐, 加藤隆史他: マウス咬筋および顎筋の筋活動に対するシタロプラムの影響. 第57回歯科基礎医学会学術大会, 2015/09/12, 新潟.

28) Nakamura S, Nagata S, Nakayama K, Mochizuki A, *et al.*: Glutamatergic response properties in developing jaw-closing motoneuron dendrites. 第38回日本神経科学大会, 2015/7/29, 神戸.

29) 立川哲史, 中山希世美, 望月文子, 中村史朗他: 除脳ラット灌流標本を用いた自発呼吸に伴う顎筋支配神経活動の解析. 第322回昭和大学学士会例会, 2015/6/27, 東京.

30) 野川泰葉, 望月文子, 片山慶祐, 安部友佳他: シタロプラムがマウス咬筋および顎筋筋活動に及ぼす影響. 日本補綴歯科学会124回学術大会, 2015/05/31, 大宮.

31) 玄番千夏子, 中山希世美, 井上富雄, 井上美津子: ラットにおける下顎反射の調節へのヒスタミンH1受容体の関与. 第53回日本小児歯科学会大会, 2015/5/21-22, 広島.

32) 立川哲史, 中山希世美, 望月文子, 中村史朗他: 除脳ラット灌流標本を用いた自発呼吸に伴う顎筋支配神経活動の解析. 第54回日本顎口腔機能学会, 2015/4/19, 鹿児島.

〔図書〕(計 5件)

- 1) 井上富雄:筋電図法の基礎;新 よくわかる顎口腔機能 咬合・摂食嚥下・発音を理解する(日本顎口腔機能学会 編)、医歯薬出版、2 - 5頁、2017. 総ページ数287.
- 2) 井上富雄, 中村史朗:咀嚼の意義と効用;新 よくわかる顎口腔機能 咬合・摂食嚥下・発音を理解する(日本顎口腔機能学会 編)、医歯薬出版、123 - 125頁、2017. 総ページ数287.
- 3) 井上富雄:咀嚼と脳 咀嚼の中枢制御機構 ;新 よくわかる顎口腔機能 咬合・摂食嚥下・発音を理解する(日本顎口腔機能学会 編)、医歯薬出版、129 - 134頁、2017. 総ページ数287.
- 4) 井上富雄, 中村史朗:神経筋の生理学;咬合のサイエンスとアート(Martin Gross著, 小谷野 潔 監訳)、クインテッセンス出版、43 - 62頁、2016、8月. 総ページ数536.
- 5) 井上富雄:動物を用いた咀嚼運動研究法;顎口腔機能の検査・分析 - 基礎と実践 - 、30 - 43頁、2015. 総ページ数95.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)
なし

取得状況(計 0件)
なし

〔その他〕

ホームページ等

研究内容:

<http://www10.showa-u.ac.jp/~oralphys/item.html>

研究業績:

<http://www10.showa-u.ac.jp/~oralphys/gyoseki.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

井上 富雄 (INOUE, Tomio)

昭和大学歯学部・口腔生理学講座・教授

研究者番号: 7 0 1 8 4 7 6 0

(2)研究分担者

中山 希世美 (NAKAYAMA, Kiyomi)

昭和大学歯学部・口腔生理学講座・講師

研究者番号: 0 0 4 3 3 7 9 8

望月 文子 (MOCHIZUKI Ayako)

昭和大学歯学部・口腔生理学講座・助教
研究者番号: 1 0 4 5 3 6 4 8

韓 (清本) 仁陽 (聖史) (HAN Inyan
(KIYOMOTO Masafumi))

昭和大学歯学部・口腔生理学講座・助教
研究者番号: 0 0 7 1 2 5 5 6

(3)連携研究者
なし

(4)研究協力者
なし