

令和 6 年 9 月 30 日現在

機関番号：13101

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(A））

研究期間：2021～2023

課題番号：20KK0353

研究課題名（和文）摂食機能と呼吸機能の関連メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of interaction mechanism between feeding and respiration

研究代表者

辻村 恭憲（Tsujimura, Takanori）

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：00548935

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 10,900,000円

渡航期間： 6ヶ月

研究成果の概要（和文）：本研究は、高齢化を背景に社会的に注目されている摂食嚥下障害の理解を深めるために、摂食機能と呼吸機能の機能連関と嚥下誘発の神経機構の解明を目的とした。小動物を対象として電気生理学的、神経薬理的、組織学的実験を行い、嚥下中枢である延髄孤束核内の嚥下誘発部位の同定ならびに嚥下誘発領域である咽頭・喉頭・食道から孤束核内への投射部位の検証を行った。一連の実験から、孤束核の内側亜核、交連亜核、腹外側亜核が咽頭・喉頭・食道からの入力を受け、機械刺激による嚥下誘発に関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

嚥下は延髄にある嚥下中枢パターン発生器により制御される運動である。これまでに延髄の孤束核が嚥下誘発に関与することは報告されていたが、自然刺激で誘発される嚥下に孤束核内のどの領域が関与しているかは不明であった。本研究から、孤束核の内側亜核、交連亜核、腹外側亜核が機械刺激で誘発される嚥下反射に重要な役割を果たすことがわかった。これら領域を標的とした研究を進めることは、嚥下障害の病態解明や新規治療法の開発へとつながると期待できる。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to clarify the relationship between feeding and respiration and the neural mechanism of initiation of swallowing. Male rodents were used in this study. Using electrophysiological, neuropharmacological and histological approaches, we tried to identify the region within the nucleus of the solitary tract (nTS) involved in the initiation of swallowing and to investigate the projection area within the nTS from the pharynx, larynx and esophagus which are regions to initiate swallowing. The results suggest that medial, commissural and ventrolateral subnuclei within the nTS receive inputs from the pharynx, larynx and esophagus and are involved in the initiation of mechanically evoked swallows. Further research that specifically targets these subnuclei will help to uncover the pathological mechanism of dysphagia and to facilitate the development of novel rehabilitation methods for patients with dysphagia.

研究分野：摂食嚥下障害学

キーワード：嚥下 呼吸 孤束核 迷走神経 喉頭 咽頭 食道 動物

## 様式 F - 19 - 2

### 1. 研究開始当初の背景

高齢者数の増加を背景に、健康寿命延伸に向けた取り組みが行われている。要介護高齢者の死因1位は肺炎であり、その多くが摂食嚥下障害に起因する誤嚥性肺炎である。摂食嚥下障害患者では、咀嚼中に適切なタイミングで嚥下が誘発されないことで食物誤嚥を認めることがある。嚥下を適切なタイミングで誘発するためには、嚥下誘発メカニズムの解明および呼吸と嚥下の関連性の検証が不可欠である。

### 2. 研究の目的

本国際共同研究では、摂食機能と呼吸機能の機能連関と嚥下誘発の神経機構の解明を目的とし、嚥下中枢として知られる孤束核内の嚥下誘発部位の同定、咽頭・喉頭・食道からの求心性入力に由来する孤束核内への投射部位の検証、嚥下機能と呼吸機能との関連の検証を行った。

### 3. 研究の方法

#### (1) 嚥下誘発実験

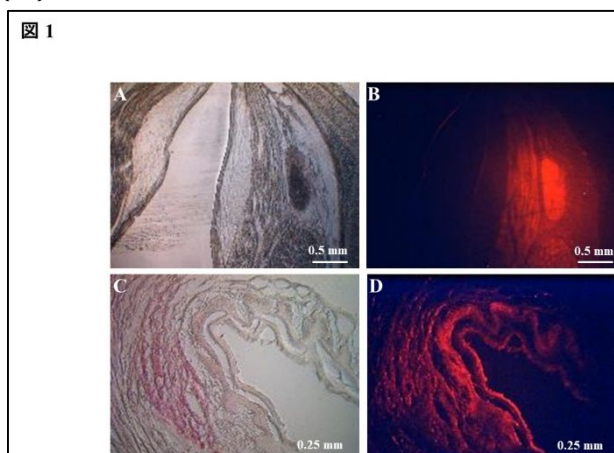
実験はHartley系雄性モルモット(200-300g)を使用した。ウレタン(1.5g/kg)の腹腔内投与により全身麻酔を行い、必要に応じてウレタンを追加投与して、瞬目反射と自発の眼球運動が消失するよう麻酔深度を調節した。左側の舌骨上筋に電極間距離2mmで双極銅電極を留置し、筋活動電位を計測した。アゴニスト微量注入実験では、筋電図とともに食道内圧を計測し、嚥下の指標とした。アンタゴニスト微量注入実験では、気管上部に設置したカニューレから喉頭側に向かって持続的なエアフロー(20mL/秒)を与えることにより嚥下を誘発し、筋電図と上気道圧から嚥下を同定した。アゴニストとアンタゴニスト微量注入のため、頭部を切開、頭蓋骨を露出し、基準点としてラムダ縫合を確認した。脳幹へのアプローチを可能にするため、歯科用エンジンとラウンドバーを用いて、頭蓋骨に小さな穴を作製した。微小ガラス電極を使い、100nl/分の速度で微量注入を行った。アゴニスト注入実験では、グルタミン酸NMDA型受容体アゴニストのNMDA、非NMDA受容体であるカニン酸受容体アゴニストのカニン酸、TRPV1受容体アゴニストのカプサイシンの微量注入を行い、嚥下誘発と呼吸変化を検証した。アンタゴニスト注入実験では、NMDA型受容体および非NMDA型受容体のアンタゴニストであるAP-5およびCNQXを同時に投与し、エアフロー誘発嚥下の変調効果を検証した。微量注入実験後、エバンスブルーを同じコーディネートで注入し、組織切片を作成して投与部位を同定した。

#### (2) 神経追跡実験

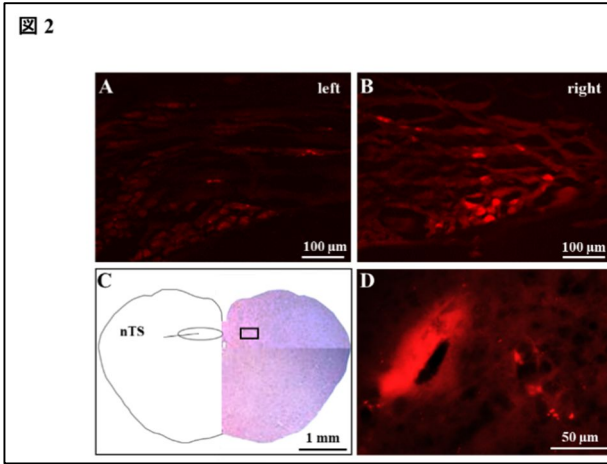
神経追跡実験では、トレーサーを咽頭、喉頭、食道へと注入し、迷走神経節および脳幹の切片を作成して検証した。モルモットをケタミン(60mg/kg)とキシラジン(6mg/kg)の筋注で一過性に全身麻酔し、30ゲージの注射針を使用して、DiI(2%)、WGA-HRP(2%)またはCTB-HRP(0.5%)を右側の喉頭、咽頭、頸部食道に各3μl注入した。モルモットの生存期間は、先行研究を参考に、DiIを60日、WGA-HRPを4日、CTB-HRPを10日と設定した。いずれも深麻酔下において、生理食塩水50mlに続いて、DiIは4%パラホルムアルデヒドを、WGA-HRPとCTB-HRPは1%パラホルムアルデヒドと1.25%グルタルアルデヒドの混合液をそれぞれ500ml用いて灌流固定を行った。脳幹と迷走神経節を摘出後、DiIについてはホルマリンによる後固定を行い、20μmの凍結切片を作成した。DiI実験では2匹のモルモットの左右の迷走神経節から切片を作成した。脳幹においては、obexの0.1mm尾側から1.4mm吻側までの切片を作成した。DiI標識迷走神経求心性神経細胞数とDiI様蛍光沈着物の数をImageJソフトウェアを用いて計測した。さらに孤束核においては正中とDiI様蛍光沈着物の距離も計測した。WGA-HRPおよびCTB-HRPについては脳幹摘出後、組織の損傷を避けるため凍結せず、ピプラトームにて100μm連続切片を作成し、TMB法(Mesulam, 1978)により染色を行った。

### 4. 研究成果

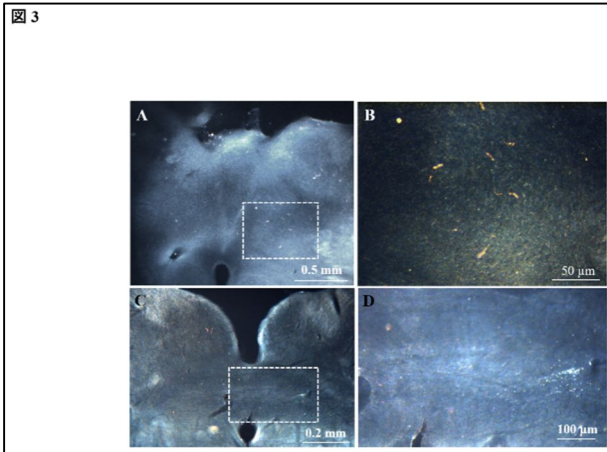
#### (1) 孤束核内の求心性神経の逆行性標識



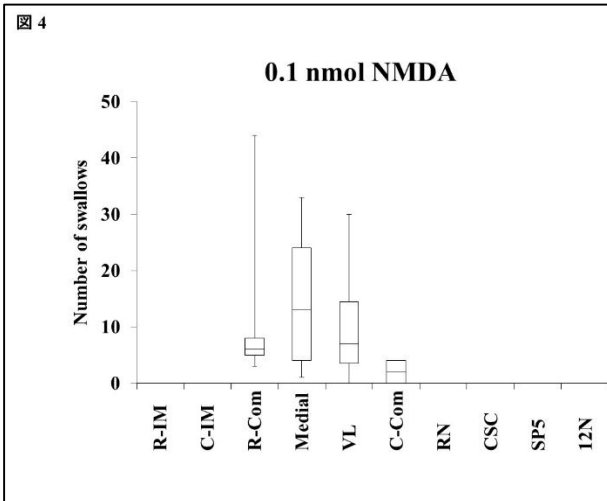
気道へのエアフロー刺激により誘発された機械刺激誘発嚥下に関連する孤束核亜核を同定するための実験を計画した。エアフロー刺激の標的領域には咽頭、喉頭、食道が含まれていると考えられたため、最初に神経追跡アプローチを使って、喉頭、咽頭、食道から脳幹へと投射される末梢感覚神経終末部の同定を試みた。DiIは右側の喉頭、咽頭、食道の粘膜および粘膜下に注入され(図1A,B:喉頭,C,D:食道)、8週後に注入された組織が迷走感覚神経節と脳幹とともに摘出された。逆行性に標識された迷走神経求心性神経が、両側の節状神経節および頸静脈神経節で観察され、それは注入と同側の神経節で優位(80-92%)であった(図



2 A,B). 脳幹で観察された DiI 様の沈着物を各切片で計測し、孤束核内の総数を両側で定量化した。ネガティブコントロールとして、錐体路の蛍光を定量化した。予想されたように、DiI 沈着物は DiI 注入の同側の孤束核内に不均等に観察された (図 2 C,D)。その孤束核亜核には、交連亜核 (obex の 0.2-0.5mm 吻側)、内側亜核が含まれ、観察された数は少ないものの中間亜核、腹外側亜核においても確認された。疑核の運動神経細胞でも標識されたが、錐体路や他の脳幹領域では、ほとんど検出されなかった。DiI 神経追跡の結果は、HRP を使った追跡研究によって正当性が示された。すなわち、C 線維マーカである WGA-HRP の孤束核内の求心性線維は交連亜核、内側亜核、腹外側亜核および三叉神経傍核で確認された (図 3A, B)。A 線維マーカである CTB-HRP は主に内側亜核で確認された (図 3C, D)。

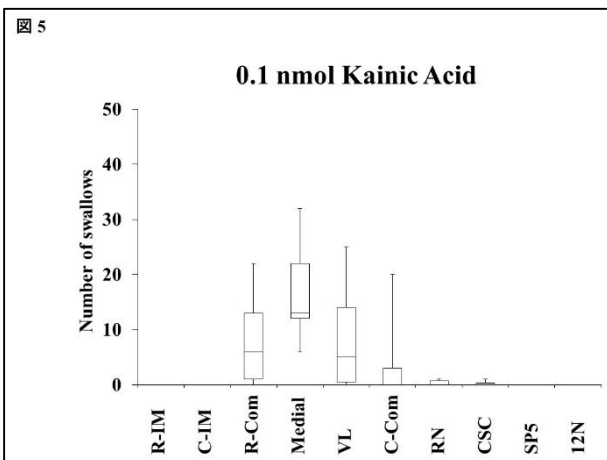


以前に報告されたモルモットの定位固定コーディネートを使って、孤束核内側亜核、交連亜核、腹外側亜核が嚥下誘発に関連しているか評価した。この仮説を検証するために、上気道拡張により誘発された嚥下におけるグルタミン酸アンタゴニスト微量注入効果を調べた。さらに、孤束核およびその付近に片側性または両側性に NMDA、カイニン酸、カプサイシンまたはグルタミン酸受容体アンタゴニストを微量注入して嚥下を計測した。157 実験で、353 試行を行い、213 注入部位 (60%) が、実験後のエバンスブルー注入により確認できた。解析には、標的領域への注入が確認されたデータのみを使用した。



## (2) グルタミン酸受容体アゴニスト微量注入の嚥下誘発効果

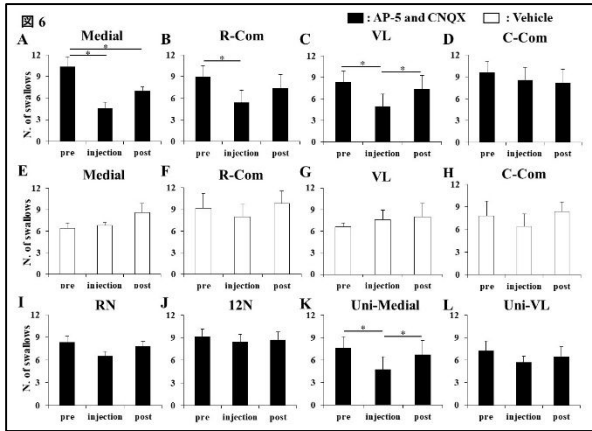
NMDA、カイニン酸、カプサイシンの微量注入の効果を検証した。吻側交連亜核 (R-Com)、内側亜核 (Medial)、腹外側亜核 (VL) を含むいくつかの孤束核亜核への NMDA またはカイニン酸の片側性注入によって、嚥下が多数誘発された (図 4 および 5)。注目すべきは、嚥下は中間亜核 (R-IM および C-IM) への NMDA やカイニン酸注入では誘発されず、尾側交連亜核 (C-Com) では数匹の動物だけが嚥下を誘発させたことである。NMDA とカイニン酸で定量的、定性的、部位特異的な違いは、ほとんど認められなかった。



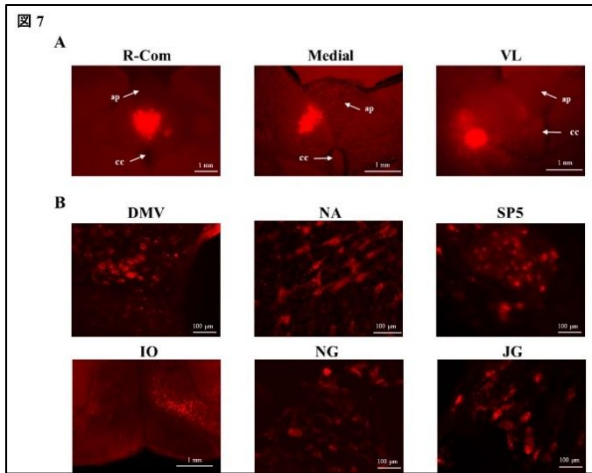
NMDA やカイニン酸微量注入は多数の嚥下を誘発した。対照的に、孤束核 6 領域へのカプサイシン微量注入は嚥下を誘発しなかったが、交連亜核への微量注入では顕著に呼吸数が増加した。また、網様核 (RN)、頸髄 (CSC)、三叉神経脊髄路核 (SP5)、舌下神経核 (12N) への NMDA、カイニン酸、カプサイシン微量注入は、いずれも嚥下を誘発しなかった。

## (3) グルタミン酸阻害による上気道拡張誘発嚥下の抑制

神経追跡研究と NMDA、カイニン酸微量注入の結果からは、交連亜核、内側亜核、腹外側亜



核が嚔下誘発に関与していることが推察された。そこで、グルタミン酸受容体拮抗薬である AP5 と CNQX の混合溶液をこれら領域に注入して、上気道拡張による機械刺激誘発嚔下の変調効果を検証した。グルタミン酸受容体拮抗薬の微量注入は、吻側交連亜核 (R-Com)、内側亜核 (Medial)、腹外側亜核 (VL) で嚔下を抑制したが、尾側交連亜核 (C-Com) では効果が認められなかった (図 6)。片側内側亜核 (Uni-Medial) へのグルタミン酸受容体拮抗薬微量注入は、機械刺激誘発嚔下を抑制したが、片側腹外側亜核 (Uni-VL) への微量注入は効果がみられなかった。AP-5 と CNQX の抑制効果は短時間であり、注入 30 分後にはベースラインもしくはその付近まで嚔下誘発応答は戻ってきていた。AP-5 と CNQX への溶媒 (Vehicle) の微量注入は、検証した全ての脳幹領域で上気道誘発嚔下の変調効果を認めなかった。さらに、AP-5 と CNQX の網様体 (RN)、舌下神経核 (12N) への微量注入は機械刺激誘発嚔下に影響しなかった。



これまでの嚔下研究で示唆された孤束核神経に関連した神経ネットワークマップを考えるために、DiI を吻側交連亜核 (R-Com)、内側亜核 (Medial)、腹外側 (VL) 亜核へ投与した。節状神経節 (NG) および頸静脈神経節 (JG) に加えて、三叉神経脊髄路核 (SP5)、疑核 (NA) において標識細胞が確認された。

(図 7)。下オリーブ (IO) の神経細胞は交連亜核と腹外側亜核から標識されたが、内側亜核からは標識されなかった。

一連の研究から NMDA または非 NMDA グルタミン酸受容体アゴニストの孤束核交連亜核、内側亜核、腹外側亜核への微量注入により嚔下が誘発され、これらの亜核は嚔下を調節する求心性神経の潜在的な神経終末部位として同定された。さらに、これらの亜核への NMDA と非 NMDA グルタミン酸受容体拮抗薬の同時注入は、上気道拡張誘発嚔下を抑制することを明らかにした。このことは、孤束核交連亜核、内側亜核、腹外側亜核が機械刺激で誘発された嚔下の末梢の感覚入力統合に重要な部位であることを示唆している。

持続的なエアフローによる上気道拡張が喉頭、咽頭、食道を標的とするという刺激の性質を考慮すると、複数の孤束核領域が嚔下反射に関連するのは驚きではない。多くの求心性神経が機械刺激により活性化されていると考えられるため、標的であるグルタミン酸受容体拮抗薬の微量注入で誘発嚔下反射の完全な抑制ができなかったことも驚きではない。機械刺激誘発嚔下実験と逆行性標識実験から、本研究で使用した生理学的刺激に対する嚔下応答に関連する喉頭、咽頭、食道からの求心性神経終末部位を識別できた。この機能研究において示唆された孤束核標的部位が機械刺激後または誘発嚔下中に活性化された可能性を排除できないが、本研究結果は孤束核交連亜核、内側亜核、腹外側亜核が上気道拡張刺激による嚔下誘発に強く関連していることを示唆する。

微量注入実験による NMDA 受容体の活性化が、嚔下を誘発したことは興味深い。嚔下は恒常性と気道防御機能に不可欠であるが、NMDA 受容体は使用に依存して脱感作されやすい。グルタミン酸受容体の阻害実験では反射嚔下中の NMDA と非 NMDA 受容体の貢献度の比較を評価できていない。嚔下の符号化に対する NMDA 受容体の主要な役割に反して、繰り返し誘発される嚔下反射の脱感作の証拠は確認できていない。我々がラットで以前に行った研究では、NMDA 受容体の阻害薬であるメマンチンやデキストロメトルファンは機械刺激誘発反射に効果を示さなかった (Tsujiura et al, 2016)。NMDA 注入実験の結果は、嚔下に関連する孤束核神経のイオン型グルタミン酸受容体の共発現を明らかにしただけで、反射機能には不可欠ではないかもしれない。もし NMDA 受容体が嚔下の符号化に関与しているならば、嚔下障害に対するそれらの潜在的役割は、さらなる研究に値するだろう。

嚔下は気道防御に重要な役割を果たしている。嚔下の中樞パターン発生器は呼吸に関連する神経ネットワークとの協調が不可欠で、嚔下のほかに呼吸や咳などの運動にも関与する上気道の筋をシームレスに誘導する。本研究で孤束核の内側亜核は嚔下に関連することが示唆され、そこは過去の我々の研究で咳における関連が示されていることは注目すべきである (Canning et al, 2010)。さらに過去の研究では、咳と嚔下は両方とも気管粘膜から誘発でき、おそらく同じ感覚神経で誘発されることも示唆されている (Tsujiura et al, 2013)。

ヒトや動物の研究では、咽頭や喉頭粘膜へのカプサイシン刺激は嚔下の誘発に効果的である

ことが明らかになっている (Ebihara et al, 1993; Tsujimura et al, 2013)。カプサイシンはC線維に主に発現している TRPV1 を通して作用する。我々の逆行性追跡研究では、神経堤由来で主にはC線維である頸静脈神経節から喉頭、咽頭、食道へ投射する多くの求心性神経を同定している。カプサイシンの孤束核亜核への微量注入が嚥下誘発に失敗し、NMDA 受容体とカイニン酸受容体の活性化では嚥下誘発したことは予想外であった。使用したカプサイシン量は適切であり、交連亜核へのカプサイシン投与により顕著な頻呼吸を観察することができた。C線維は確実に嚥下を調節するが、孤束核のTRPV1の活性化が嚥下誘発に効果的でないことが明らかとなった。喉頭へのカプサイシン投与とは異なり、孤束核へのカプサイシン微量注入は喉頭求心性神経だけでなく、孤束核の標的亜核の全ての TRPV1 発現神経終末を活性化する。本研究においては、C線維の異なるサブタイプは反対の結果を生じており (Chou et al, 2018)、同じようなことが嚥下に生じているかもしれない。また反射に対する麻酔の影響も考慮すべきであり、加えて頸静脈求心性神経の多くが投射するとされる三叉神経傍核の嚥下への役割も検証されていない。一方で、C線維は上気道拡張機械刺激に対して比較的鈍感であることから、上気道刺激嚥下誘発には主要な役割を果たしておらず、調節的に関与しているのかもしれない。

本研究により、孤束核の内側亜核、交連亜核、腹外側亜核が機械刺激で誘発される嚥下反射に重要な役割を果たすことがわかった。これら領域を標的とした研究を進めることは、摂食機能と呼吸機能の関連性、嚥下障害の病態解明や新規治療法の開発へとつながると期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tsujimura Takanori, Nakajima Yuta, Chotirungsan Titi, Kawada Satomi, Tsutsui Yuhei, Yoshihara Midori, Suzuki Taku, Nagoya Kouta, Magara Jin, Inoue Makoto	4. 巻 -
2. 論文標題 Inhibition of Water-Evoked Swallowing During Noxious Mechanical Stimulation of Tongue in Anesthetized Rats	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Dysphagia	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00455-022-10522-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Takanori Tsujimura, Brendan Canning, Makoto Inoue
2. 発表標題 NMDA and non-NMDA glutamate receptors in the rostral-commissural, medial, and ventrolateral nTS subnuclei are involved in the initiation of swallows in anesthetized guinea pigs
3. 学会等名 31st Dysphagia Research Society Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Takanori Tsujimura
2. 発表標題 Mechanisms of swallowing initiation and its impairment
3. 学会等名 International Collaborative Symposium on Development of Human Resources in Practical Oral Health and Treatment 2023 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 辻村恭憲, 吉原 翠, 井上 誠
2. 発表標題 実験動物を用いた嚥下神経機構の解明
3. 学会等名 第64回日本平滑筋学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 辻村恭憲, Brendan J Canning, 井上 誠
2. 発表標題 孤束核のグルタミン酸受容体は嚥下誘発に関与する
3. 学会等名 第45回嚥下医学会学術講演会(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takanori Tsujimura, Makoto Inoue
2. 発表標題 Peripheral mechanisms of mechanically evoked swallows
3. 学会等名 2nd World Dysphagia Summit(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 辻村恭憲, 井上 誠
2. 発表標題 炭酸刺激による嚥下誘発メカニズム
3. 学会等名 第26・27回合同学術大会日本摂食嚥下リハビリテーション学会(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 辻村恭憲	4. 発行年 2022年
2. 出版社 メジカルビュー社	5. 総ページ数 6
3. 書名 Crosslink言語聴覚療法学テキスト	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	カンニング ブレンダン	ジョンズホプキンス大学・アレルギー喘息センター・教授	
	(Canning Brendan)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
米国	ジョンズホプキンス大学医学部		