

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500640

研究課題名(和文) 神経機能を加味した誤嚥ラットモデル作成と感覚刺激に対する嚥下評価法の検討

研究課題名(英文) Swallowing dysfunction model: Examination of swallowing function by afferent stimulation

研究代表者

狩野 充浩 (Mitsuhiro, Kano)

東北大学・歯学研究科(研究院)・大学院非常勤講師

研究者番号：10419236

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,400,000円、(間接経費) 420,000円

研究成果の概要(和文)：ラット咽頭喉頭・軟口蓋において、カプサイシン受容体(TRPV1)、高温度(52℃以上)のセンサー(TRPV2)、神経ペプチドであるgalaninの免疫染色を行った。TRPV1やgalaninを含む神経線維は粘膜固有層に多く、一部は上皮内にも侵入していた。TRPV1線維は咽頭鼻部や喉頭蓋粘膜で最も多く、galanin線維は咽頭喉頭部・喉頭蓋・軟口蓋粘膜で見られた。TRPV2線維の分布は一部を除いて不明であった。更にTRPV1線維は、主に迷走神経上神経節や舌咽神経節由来である事が判明した。また神経伝達物質輸送を阻害するコルヒチンを迷走神経及び上喉頭神経に注入しても明らかな嚥下障害は見られなかった。

研究成果の概要(英文)：Damage of sensory neurons innervating the pharynx can cause swallowing dysfunction in animal models. In this study, distribution of sensory nerve fibers was examined in the rat epiglottis and pharynx by immunohistochemical methods. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-immunoreactive (PACAP-IR) nerve fibers were located beneath the mucous epithelium, and occasionally penetrated the epithelium. PACAP-IR nerve fibers were also detected in taste buds within the epiglottis and pharynx. Retrograde tracing method also demonstrated that PACAP was expressed by vagal and glossopharyngeal sensory neurons innervating the pharynx. These findings suggest that PACAP-IR nerve fibers in the epithelium and taste bud of the epiglottis and pharynx which originate from the vagal and glossopharyngeal sensory ganglia include nociceptors and chemoreceptors. Injury of PACAP-IR neurons innervating the pharynx and epiglottis may cause swallowing dysfunction.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学 リハビリテーション科学・福祉工学

キーワード：嚥下機能 リハビリテーション

1. 研究開始当初の背景

嚥下機能は現在の高齢化社会において生活を営む上で、あるいは生活の質（QOL）の向上という点からも重要な機能の1つである。しかし高齢者の死因の上位に肺炎が含まれ、その中でも誤嚥性肺炎が問題視されており、誤嚥性肺炎の患者の肺から口腔内細菌が検出されるなど歯科においても重要度の高い問題の1つである。

嚥下反射は様々な器官が関わる複雑な機構によっておこるものであり、誤嚥の原因は多岐にわたる。これまで嚥下反射に関する研究は様々な方法で行なわれており、その中で加齢変化の影響についても検討されてきた。また臨床的には嚥下反射を改善する方法として、味覚や嗅覚などの感覚刺激を利用する方法等が行なわれており、嗅覚刺激がヒトの嚥下反射を改善することなどが報告されている。

我々は今までヒト剖検症例を用いて嚥下に関わる舌や喉頭蓋の加齢変化を組織学的に検討し喉頭蓋弾性軟骨が加齢に伴い特に男性において著明な石灰化が生じることなどを解明し、そのような加齢変化が嚥下機能にどのような影響を与えるかについて考察した。しかし嚥下反射に対する各種感覚刺激の嚥下反射に対する改善効果は一部限定的にしか解明されておらず依然不明な点がある。

そのため今回我々は新たに神経学的手法を用いた嚥下反射の評価法の確立と嚥下に対する病的変化（加齢）と味覚、嗅覚などの各種感覚刺激の嚥下反射改善効果を体系的に評価するために、正常及び神経切断誤嚥ラットモデルや筋萎縮症モデルマウスを作成し、咽頭喉頭領域の知覚や運動に関わる舌咽神経や迷走神経の入力や出力に関わる神経節におけるイオンチャンネルや変性マーカーである神経ペプチドの分布を検討すること

にした。

2. 研究の目的

本研究では、嚥下反射の評価法の確立と嚥下に対する病的変化（加齢）と味覚、嗅覚などの各種感覚刺激の嚥下反射改善効果を体系的に評価するために、誤嚥ラットモデルを作成し、咽頭喉頭領域の知覚や運動に関わる舌咽神経や迷走神経の入力や出力に関わる神経節内や嚥下の制御に関わる大脳、脳幹の変化について明らかにすることを目的としている。しかしながら、現在にいたるまで正常ラットの咽頭粘膜や咽頭筋の神経支配については報告が少なく、ほとんど明らかではない。そこで、本研究では、まず咽頭各部や喉頭の粘膜における感覚神経の分布や由来について調べた。また、舌咽神経や上喉頭神経切断により、誤嚥ラットモデルの作成を行う予定であった。しかし、これらの神経を切断するためには、その手術の際に咽頭や周囲組織の挫滅が生じる。したがって、それらの動物に誤嚥を生じさせることができたとしても、それが感覚異常によるものか、それとも咽頭筋などの変性によるものかが判断できない。そこで、感覚神経損傷のマーカーの分布を正常及び誤嚥（神経切断）ラットの咽頭及び舌咽・迷走神経節の感覚ニューロンで明らかにすることにした。

3. 研究の方法

実験には正常ラット5匹を用いた。動物を麻酔後、Zamboni固定液で灌流し、鼻腔、口腔、咽頭、喉頭及び上位の食道、気管を一塊に取り出し、凍結切片作製後、カプサイシンレセプターである vanilloid receptor subtype 1 (VR1, TRPV1)、52 以上の高温度に対するセンサーである vanilloid receptor subtype 1-like receptor (VRL-1, TRPV2)及び galanin に対する免疫染色を行った。

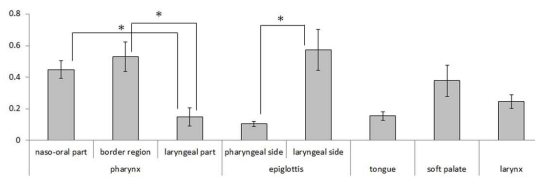


図1 咽頭・喉頭・軟口蓋における TRPV1 線維の分布 (The distribution of TRPV1 and TRPV2 in the rat pharynx. *Cellular and Molecular Neurobiology*. 33(5):707-714, 2013 より引用)

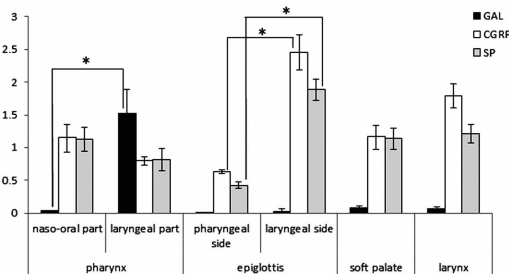


図1 咽頭・喉頭・軟口蓋における galanin, CGRP, SP 線維の分布 (The distribution of galanin-immunoreactive nerve fibers in the rat pharynx. *Neuropeptides*. 47(4):231-236, 2013 より引用)

4. 研究成果

TRPV1 を含む神経線維が咽頭粘膜に豊富に観察された。これらの神経線維は粘膜固有層に数多く認められ、それらの一部は上皮内に侵入していた。TRPV1 を含む神経線維は咽頭鼻部や喉頭蓋の喉頭側粘膜で最も多く観察された (図 1)。TRPV2 は上皮内や固有層の樹状細胞に認められたが、TRPV2 を含む神経線維の分布は不明であった。咽頭鼻部と喉頭部の境界部や軟口蓋にトレーサーを注入した結果、迷走神経上神経節や舌咽神経節、さらに迷走神経下神経節の吻側部における感覚ニューロンが TRPV1 や TRPV2 を含む神経線維の由来であることが明らかとなった。

一方、galanin を含む神経線維が咽頭やその周囲組織で豊富に観察された。これらの神経線維は粘膜固有層に数多く認められ、それらの一部は上皮内や味蕾内に侵入していた。galanin を含む神経線維は咽頭喉頭部・喉頭蓋の喉頭側・軟口蓋粘膜で最も多く観察された (図 2)。舌咽・迷走神経節においては、galanin は、多くの小型ニューロンに認められた。

また神経伝達物質の輸送を阻害すると考えられるコルヒチンを迷走神経及び上喉頭神経に注入したが明らかな嚥下障害は見られなかった。残念ながら、研究期間内に、誤嚥 (神経切断) ラット咽頭における galanin の分布や舌咽・迷走神経節における感覚ニューロンの変性については明らかにできなかったが、それらを今後の検討課題とするつもりである。さらに神経筋疾患モデルマウスにおける咽頭や喉頭における筋の委縮について観察し、それらの嚥下機能について検討する予定である。

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3件)

- (1) Toshihiko Suzuki, Tadasu Sato, Mitsuhiro Kano and Hiroyuki Ichikawa. The distribution of galanin-immunoreactive nerve fibers in the rat pharynx. *Neuropeptides*. 47(4):231-236, 2013 (査読有)
DOI:10.1016/j.nep.2013.05.001
- (2) Rika Sasaki, Tadasu Sato, Takehiro Yajima, Mitsuhiro Kano, Toshihiko Suzuki and Hiroyuki Ichikawa. The distribution of TRPV1 and TRPV2 in the rat pharynx. *Cellular and Molecular Neurobiology*. 33(5):707-714, 2013 (査読有)
DOI:10.1007/s10571-013-9938-3.
- (3) Tadasu Sato, Masatoshi Fujita, Mitsuhiro Kano, Hiroshi Hosokawa, Teruyoshi Kondo, Toshihiko Suzuki, Eriko Kasahara, Noriaki Shoji, Takashi Sasano and Hiroyuki Ichikawa. The Distribution of Transient Receptor Potential Melastatin-8 in the Rat Soft Palate, Epiglottis, and Pharynx.

〔学会発表〕(計5件)

- (1) 佐藤 匡、矢島 健大、狩野 充浩、鈴木 敏彦、市川 博之。ラット咽頭及びその周囲組織における TRPV1 と TRPV2 の分布 第 55 回歯科基礎医学会 学術大会・総会 平成 25 年 9 月 20 日(金) ~ 22 日(日) 岡山
- (2) 佐藤 匡、佐々木 里香、藤田 雅俊、狩野 充浩、澤浦 亮平、鈴木 敏彦、市川 博之。ラット軟口蓋、喉頭蓋及び咽頭における TRPM8, TRPV1, TRPV2 の分布 日本解剖学会 第 59 回東北・北海道連合支部学術集会 平成 25 年 9 月 14 日(土) ~ 15 日(日) 札幌
- (3) Tadasu Sato, Rika Sasaki, Mitsuhiro Kano, Toshihiko Suzuki, and Hiroyuki Ichikawa. THE DISTRIBUTION OF TRPV1 AND TRPV2 IN THE RAT PHARYNX. ASahct2013 International of Symposium Anatomical Science for advance in health and clinical therapy 平成 25 年 8 月 27 日(水) ~ 28 日(木) 仙台
- (4) 佐藤 匡、藤田 雅俊、狩野 充浩、鈴木 敏彦、市川 博之。ラット軟口蓋、喉頭蓋及び咽頭における TRPM8 の分布 第 54 回歯科基礎医学会 学術大会ならびに総会 平成 24 年 9 月 14 日(金) ~ 16 日(日) 郡山
- (5) 藤田 雅俊、佐藤 匡、狩野 充浩、清水 良央、金高 弘恭、鈴木 敏彦、市川 博之。Dmu マウスにおける骨格筋及び運動ニューロンの変性 第 54 回歯科基礎医学会 学術大会ならびに総会 平成 24 年 9 月 14 日(金) ~ 16 日(日) 郡山

6. 研究組織

(1)研究代表者

狩野 充浩 (KANO, MITSUHIRO)
東北大学・大学院歯学研究科・大学院非常勤講師
研究者番号： 10419236

(2)連携研究者

市川 博之 (ICHIKAWA, HIROYUKI)
東北大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号： 20193435