

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：15201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861561

研究課題名(和文) 発声における内喉頭筋調節機構の実験形態学的解析

研究課題名(英文) Morphological analysis of the control mechanisms of intrinsic laryngeal muscles during vocalization

研究代表者

岡 達郎 (Oka, Tatsuro)

島根大学・医学部・助教

研究者番号：20508923

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、発声運動を調節する中枢神経機構の一端を形態学的立場から明らかにすることを目的とし、中心灰白質から延髄網様体を経て内喉頭筋を支配する疑核運動ニューロンへ至る神経路の存在様式を、順行性および逆行性標識法を利用して解析した。その結果、疑核後核の軸索終末の分布領域と、輪状甲状筋を支配するニューロンの分布領域の一致を疑核吻側部において認めた。さらにこの領域を電子顕微鏡下で解析した結果、両者の間に非対称性シナプスが形成されることを確認した。過去の報告と併せて考えると、中心灰白質から疑核後核を経て内喉頭筋支配運動ニューロンへ至る興奮性神経路が発声の調節に関わることが示唆される。

研究成果の概要(英文)：In the present study, to elucidate control mechanisms of intrinsic laryngeal muscles during vocalization, we examined the synaptic connections between the projection fibers from the periaqueductal gray (PAG) to the motoneurons that innervate intrinsic laryngeal muscle via medullary reticular formation by using anterograde and retrograde tract-tracing techniques. As a result, prominent overlapping distribution of the nucleus retroambiguus (NRA) axons and cricothyroid motoneurons was observed in the rostral part of the nucleus ambiguus. Furthermore, electron microscopic observation revealed that NRA terminals made asymmetrical synaptic contacts with cricothyroid motoneurons in the nucleus ambiguus. The present data, combined with previous studies, suggest that output signals from the PAG are transmitted disynaptically to the cricothyroid motoneurons via the NRA neurons for the control of vocalization.

研究分野：神経解剖学

キーワード：発声 喉頭 疑核 疑核後核 中心灰白質 神経路標識法 神経回路 ラット

1. 研究開始当初の背景

喉頭の代表的な機能には発声、呼吸、嚥下が挙げられる。喉頭筋の運動は、直接的には延髄疑核に存在する運動ニューロンから迷走神経を介して制御されているが、これらの運動を円滑に遂行するために、疑核には上位中枢からの複雑な入力があることが示唆されている。申請者はこれまで、発声を引き起こす脳幹の神経機構に辺縁系が如何に作用するのかを知る目的で、扁桃体中心核から中脳中心灰白質を経て疑核後核(発声に関わる運動前ニューロンが存在する神経核)へ至る神経路の存在と、その神経路を構成するニューロンの化学的性質を明らかにしてきた。その過程で、発声に関わる内喉頭筋の運動を直接的に制御している疑核運動ニューロンが、中心灰白質から脳幹網様体に存在する運動前ニューロンを介して、どのような調節を受けているのかという疑問を抱くようになった。

疑核後核は延髄腹外側部において、疑核の尾側に存在する神経核であり、発声や呼吸の調節に関わる運動前ニューロンプールとして知られている。過去の研究から、疑核後核ニューロンの軸索突起は上行性に反対側の疑核に達して喉頭や咽頭の筋肉を支配する運動ニューロンへ出力し、また下行性に反対側の脊髄前角に投射して呼吸筋を支配する運動ニューロンへ出力すると考えられている。しかし、疑核に投射する運動前ニューロンは疑核後核のみならず、結合腕傍核をはじめとする脳幹網様体に広く分布しており、これらの運動前ニューロンが発声における喉頭の運動をどのように調節しているのか、またそれらのニューロンが有する神経伝達物質については不明な点が多い。

一方で、中脳中心灰白質は中脳水道を取り囲む領域に存在する神経核で、外界の刺激に対する情動行動や情動性自律反応の制御に関わる領域である。中心灰白質を刺激すると正常発声とほとんど変わらない発声運動が誘発されることから、中心灰白質は発声行動を統合的に制御する領域であると考えられている。中心灰白質の刺激によって安静呼吸リズムが中断された後に大きな吸息を引き起こし、続いて発声と吸息が交互に起こる。このことは、中心灰白質ニューロンが興奮した結果、内喉頭筋を支配する疑核運動ニューロンや、脳幹の呼吸ニューロン群などの活動性を变化させて発声運動のパターンを形成していることを示唆している。しかし、中心灰白質の発声誘発部位を刺激することによって活性化される網様体ニューロンの分布様態、およびこれらの網様体ニューロンから内喉頭筋を支配する疑核運動ニューロンへの接続様式についての解剖学的な検討は充分になされていないのが現状である。

近年臨床的に問題となる痙攣性発声障害や多系統萎縮症に起因する声帯麻痺は、脳幹での喉頭運動ニューロン調節機構が障害を

受けることによって生じる可能性も示唆されている。本研究を完遂することによって、内喉頭筋の運動を調節している神経機構を理解するために必要な形態学的な土台を提供し、今後の薬理・生理学的研究の進展に、ひいてはこれら疾患の病態解明や治療法開発に寄与したい。

2. 研究の目的

本研究では、発声発現時の喉頭運動を直接的に制御する上記の神経路に焦点を絞り、疑核へ投射線維を送りかつ発声時に活性化する運動前ニューロンの脳幹における分布様態と神経伝達物質の同定、さらに内喉頭筋を支配する疑核運動ニューロンへの疑核後核からの入力様式について形態学的視点から明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 内喉頭筋を支配する疑核運動ニューロンへの疑核後核からの入力様式の形態学的解析

同一のラットに対して、疑核後核に順行性標識物質(BDA)を電気泳動的に注入し、輪状甲筋に逆行性標識物質(CTb)を圧注入し、その一週間後に灌流固定して脳を摘出した。

ビブラトームを用いて厚さ 30 μm の脳切片を作成した。ニッケルアンモニウムを添加した DAB 反応液により BDA 標識終末を黒色に染めた。次に抗 CTb 抗体を用いた免疫組織化学により CTb 標識ニューロンを検出した。この場合は chromogen として DAB を用いるのみであり、CTb 標識ニューロンは茶色に染まる。顕微鏡下にて BDA 標識終末と CTb 標識ニューロンの分布様態や接合様態を疑核にて解析した。

電顕観察の場合には、BDA 標識終末をアビジン-ビオチン複合体で検出した後に DAB に銀増感処理(Wang と Nakai, 1996)を施した。次に免疫組織化学により CTb 標識ニューロンを検出した。なお、CTb の検出には DAB のみを用いた。

疑核において、上記標識線維と標識ニューロンの分布が一致する領域を含む切片をエポキシに包埋して電顕試料とした。

顕微鏡下にて、BDA 標識終末と CTb 標識ニューロンとのシナプス構築を解析した。

(2) 中心灰白質発声誘発部位の刺激によって Fos 蛋白を発現する疑核運動前ニューロンの分布様態の解析

逆行性標識および Fos 標識の併用によって、疑核に投射し、中心灰白質の発声誘発部位の刺激によって活性化されるニューロンの脳幹網様体における分布を明らかにする。

疑核に逆行性標識物質であるコレラトキシン B サブユニット(CTb)を電気泳動的に注入した。

一週間後に興奮性アミノ酸(D,L-ホモシステイン酸、DLH)を中心灰白質に注入した。

その際に超音波検出装置を用いて超音波発声の有無とその性状(周波数等)を確認し記録した。なおDLH溶液にはシカゴスカイブルーを添加し、刺激部位の確認に使用した。その後すぐに灌流固定して脳を摘出した。

フリージングマイクロトームを用いて厚さ30 μmの前頭断脳切片を作成し、抗Fos抗体を用いて免疫組織化学によりFos陽性ニューロンを検出した。この場合、chromogenとしてジアミノベンチジン(DAB)を用いるが、ニッケルアンモニウムを反応液に加えることによって、Fos陽性ニューロンの細胞核を黒色に染めた。

上記反応後、抗CTb抗体を用いてCTb標識ニューロンを免疫組織化学的に検出した。この場合はchromogenとしてDABを用いるのみであり、CTb標識ニューロンは細胞質が茶色に染まる。

発声が誘発された群について、CTbにより標識されたニューロンとFos陽性ニューロンの脳幹網様体における分布の異同を光顕的に解析した。

DLHの代わりに生理食塩水を注入した場合についても同様の実験を行い、これを対照群とした。

DLHの注入部位を光顕下で確認し、これと発声の有無の関連を解析した。

4. 研究成果

まず、内喉頭筋を支配する疑核運動ニューロンへ投射する運動前ニューロンの脳幹における分布様態について検討した。内喉頭筋を支配する運動ニューロンが存在する疑核の領域に逆行性標識物質であるCTbを注入し、逆行性に標識されたニューロンの脳幹における分布様態を光学顕微鏡下で解析した。その結果、中心灰白質の他、結合腕傍核、孤束核、疑核周囲の網様体領域および疑核後核などの領域に、逆行性に標識されたニューロンが分布することを確認した。

次に、輪状甲状筋を支配する疑核運動ニューロンへの疑核後核からの入力について、光顕的・電顕的に解析を行った。疑核後核へ順行性標識物質であるBDAを、輪状甲状筋へCTbをそれぞれ注入し、BDA標識線維終末とCTb標識ニューロンの疑核領域における分布を検討した。光顕下で観察したところ、CTb標識ニューロンは、注入と同側の疑核、特に吻側部に位置するコンパクトフォーメーションの周囲に分布していた。

一方で、BDA標識線維は、注入と同側の疑核領域を含む網様体に広く分布していた。注入と反対側の疑核コンパクトフォーメーション周囲領域においても多数のBDA標識線維終末がみられた。この領域において、CTb標識ニューロンの細胞体や樹状突起とBDA標識終末が近接する像を多数認めた。

さらにこの領域を電子顕微鏡下で観察すると、反対側の疑核後核から順行性に標識されたBDA標識終末と、CTb標識ニューロンの

樹状突起および細胞体との間に非対称性シナプスが形成されることを確認した。このことから、疑核後核から輪状甲状筋支配疑核運動ニューロンへの興奮性入力の存在が示唆された。

次に、中心灰白質の発声誘発部位を刺激することによって活性化する網様体ニューロンの分布様態を検討した。興奮性アミノ酸を中心灰白質外側部へ微量注入することによって超音波発声の誘発を試みた。過去の報告を参考にしながら実験を行ったが、現時点では発声運動が誘発された例を確認できていない。多くの哺乳類において中心灰白質刺激によって発声が引き起こされることが報告されており、ラットにおいても同様の反応が引き起こされることが予想されるため、今後も引き続き刺激実験の最適化を行っていく。さらに今後は、遺伝子改変マウスを用いた最新の薬理遺伝学的方法を利用して中心灰白質ニューロンを刺激し、発声を誘発させる実験も行っていく計画である。これによって、発声運動を調節する中枢機構の解明に寄与したい。

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1件)

T. Tsumori, T. Oka, S. Yokota, JG Niu, Y. Yasui

Intrapancreatic ganglia neurons receive projection fibers from melanocortin-4 receptor-expressing neurons in the dorsal motor nucleus of the vagus nerve of the mouse

Brain Research 1537, 132-142. 2013

doi: 10.1016/j.brainres.2013.09.002.

査読有り

〔学会発表〕(計9件)

(1)横田茂文、Kaur S, Vanderhorst VG, Saper CB, 岡 達郎、安井幸彦、Chamberlin NL
高炭酸ガス負荷によって活性化する結合腕傍核から横隔神経核への連絡路

第120回日本解剖学会総会・全国学術集会、2015年3月21日~23日、神戸国際会議場・展示場(兵庫県・神戸市)

(2)小川典子、平野 了、横田茂文、松本暁洋、古谷智英、岡 達郎、安井幸彦、大谷 浩
島根大学医学部解剖学講座における二次感染予防の取り組み

第120回日本解剖学会総会・全国学術集会、2015年3月21日~23日、神戸国際会議場・展示場(兵庫県・神戸市)

(3) T. Oka, S. Yokota, H. Asano, Y. Yasui
Lateral periaqueductal gray neurons innervate cholinergic neurons in the pedunculopontine tegmental nucleus of the rat

第37回日本神経科学大会、2014年9月11日

～13日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

(4) S. Yokota, T. Oka, H. Asano, Y. Yasui
オレキシン線維は延髄腹外側部、横隔神経核、
および舌下神経核へ投射する Kölliker-Fuse
核ニューロンと接合する

第37回日本神経科学大会、2014年9月11日
～13日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

(5) T. Oka, S. Yokota, H. Asano, Y. Yasui
Lateral periaqueductal gray neurons
innervate cholinergic neurons in the
pedunculopontine tegmental nucleus of the
rat

第119回日本解剖学会総会・全国学術集会、
2014年3月27日～29日、自治医科大学(栃
木県・下野市)

(6) S. Yokota, T. Oka, H. Asano, Y. Yasui
Orexinergic inputs to Kölliker-Fuse
neurons projecting to the ventrolateral
medulla and phrenic and hypoglossal nuclei
in the rat

第119回日本解剖学会総会・全国学術集会、
2014年3月27日～29日、自治医科大学(栃
木県・下野市)

(7) T. Tsumori, T. Oka, S. Yokota, Y. Yasui
Melanocortin-4 receptor expressing
neurons in the geniculate and petrosal
ganglia send their fibers to the tongue
taste bud cell

第119回日本解剖学会総会・全国学術集会、
2014年3月27日～29日、自治医科大学(栃
木県・下野市)

(8) 岡 達郎、横田茂文、浅野裕彦、安井幸彦
ラット中心灰白質外側部から脚橋被蓋核コ
リン作動性ニューロンへの投射

日本解剖学会第68回中国・四国支部学術集
会、2013年10月19日～20日、鳥取大学医
学部(鳥取県・米子市)

(9) T. Tsumori, T. Oka, S. Yokota, Y. Yasui
Tongue taste buds receive nerve terminals
originating from melanocortin-4 receptor
expressing neurons in the mouse geniculate
and petrosal ganglia

第36回日本神経科学大会 第56回日本神経
化学会大会 第23回日本神経回路学会大会
合同大会、2013年6月20日～23日、国立京
都国際会館(京都府・京都市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡 達郎(OKA TATSURO)

島根大学・医学部・助教

研究者番号: 20508923