

平成 22 年 6 月 4 日現在

研究種目：基盤研究 (B)
研究期間：2007 ～ 2009
課題番号：19390526
研究課題名 (和文) オトガイ舌筋あるいはオトガイ舌骨筋支配神経切断モデルラットによる呼吸動態の検討
研究課題名 (英文) Behavioral observation of respiratory regulation about genioglossal and geniohyoid neurotomy rat
研究代表者 古澤 清文 (FURUSAWA KIYOFUMI) 松本歯科大学・大学院歯学独立研究科・教授 研究者番号：90165481

研究成果の概要 (和文)：口腔癌の手術時にオトガイ舌筋やオトガイ舌骨筋の切除を余儀なくされることがある。その際の呼吸動態などへの影響を明らかにする目的で、神経切断モデルラットによる研究を行った。その結果、オトガイ舌筋あるいはオトガイ舌骨筋支配神経の切断により、一過性に呼吸動態や、摂食・嚥下に影響を与えることがあるが、一定の期間を経て、回復あるいは順応することが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：This study investigated the behavioral observation of respiratory regulation about genioglossal and geniohyoid neurotomy rat. Regulation of respiration was transitory aggravated by genioglossal and geniohyoid neurotomy, but it was adapted after course.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2008 年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2009 年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
年度			
年度			
総計	14,000,000	4,200,000	18,200,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：嚥下, 咀嚼, 舌骨上筋

1. 研究開始当初の背景

口腔の代表的な機能は咀嚼で、舌や下顎などの口腔器官がシステムチックに活動することによって正常な機能を営む。また、口腔から咽頭は食物と空気の共通路になっているため、舌や下顎の運動は上気道の保持にも関わっている。舌運動はオトガイ舌筋やオト

ガイ舌骨筋などによって担われ、それらの運動ニューロンは舌下神経核に局在する。これらの運動ニューロンは、末梢からの感覚情報や上位中枢からの入力によって綿密にコントロールされ、その情報伝達には多くの神経伝達物質が関与することが知られている。神経伝達物質の中でグルタミン酸などは主入

力 (fast synaptic inputs) に関与しているのに対して、サブスタンス P などは調節性入力 (modulatory inputs) に関わっている。申請者らの研究グループは、これまでに舌運動と呼吸機能の観点から一連の研究を行い、以下の成果を得ている。

(1) 舌下神経核に局在する呼吸リズムに同期して活動するオトガイ舌筋運動ニューロン (IGGm) の運動調節に関わる神経伝達物質の中で、サブスタンス P に注目し、IGGm にサブスタンス P が与える効果について、パッチクランプ法などの電気生理学的手法を用いて検討した。そして、サブスタンス P は IGGm に対して興奮性に作用し、その効果は濃度依存性であることを示した (J. Physiol. 534, 447-464, 2001)。

(2) 舌下神経核の運動ニューロンの中に、呼吸リズムに同期して活動するオトガイ舌筋運動ニューロン (IGGm) が存在する。神経トレーサー法などによって、IGGm は舌下神経核主核でオトガイ舌筋局在領域の吻側部に局在していることを明らかにした (Somatosens. Mot. Res., 19, 30-35, 2002)。

(3) ラットのオトガイ舌骨筋は、舌下神経本幹を軸索末梢経路とする体性運動神経系に加え、頸神経ワナ経由の副交感神経による遠心性の支配を受けることを明らかにするとともに、この副交感神経は呼吸動態に関わる舌骨の位置調節に関与していることを示した (Exp. Brain Res., 153, 302-309, 2003)。また、オトガイ舌骨筋一次求心線維からの感覚情報は、副交感神経節後ニューロンの NK1 受容体を活性化することによって節後ニューロンの活動を興奮性に修飾していることを明らかにした (Brain Res. 1112, 106-113, 2006)。

以上のように、オトガイ舌筋やオトガイ舌骨筋の支配神経の機能特性には、呼吸動態に影響を与えるものがある。臨床においても、口底の腫瘍切除術に際し、オトガイ舌筋とオトガイ舌骨筋が切除範囲に含まれた症例では、術後数日間にわたり血中酸素分圧が正常であるにも関わらず、呼吸苦様症状を訴えることがある。このような症状は、前述の基礎的実験データと関係があるように思われる。

2. 研究の目的

そこで本研究では、オトガイ舌筋やオトガイ舌骨筋支配神経切断モデルラットを作製

し、それらの呼吸や摂食・嚥下様相についての行動観察を行い、オトガイ舌筋やオトガイ舌骨筋支配神経切断による影響を明らかにすることを目的とした。また、それぞれのモデルラットの中枢神経系について形態学および電気生理学的検討を加え、行動実験の結果と併せて結論を導き出すこととした。

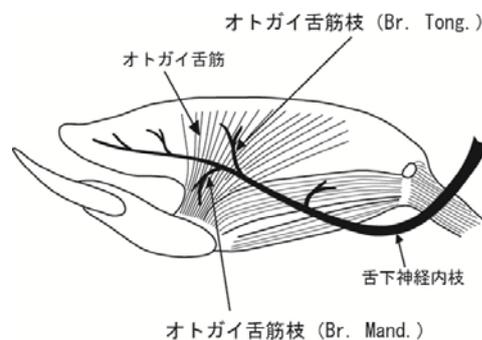
3. 研究の方法

実験 1. オトガイ舌筋あるいはオトガイ舌骨筋支配神経切断モデルラットによる行動実験

実験には 8 週齢の Wistar 系ラットを用いた。塩酸ケタミンの腹腔内投与を行い、保温パッド上でラットを仰臥位に固定し下顎前歯を利用してクランプによって下顎を固定した。

(1) オトガイ舌筋支配神経切断モデルの作製

手術用顕微鏡下で下顎骨内側から鎖骨に至る皮膚切開を加えて、咬筋および下顎骨を明示した。顎二腹筋前腹・後腹を剖出し、内側に翻転後、顎舌骨筋を切断し、オトガイ舌骨筋を翻転することによってオトガイ舌筋と舌下神経本幹を確認した。ラットの舌下神経は舌骨付近で内側枝と外側枝に別れ、内側枝はオトガイ舌骨筋とオトガイ舌筋に分枝



した後に固有舌筋群に至る。なお、オトガイ舌筋に分枝する枝 (オトガイ舌筋枝) は化学法枝に分布する枝 (Br. Mand) と舌方向に分布する枝 (Br. Tong) の 2 枝に分かれる (図)。

なお、Br. Mand には呼吸リズムに同期して活動するオトガイ舌筋運動ニューロン (IGGm) の末梢軸索が、Br. Tong は主に嚥下性の活動を示すニューロンが含まれている (Somatosens. Mot. Res., 2002)。以下の条件で、オトガイ舌筋枝の切断モデルを作製した。

①片側オトガイ舌筋枝 (Br. Mand) 切断モデル

ル

②片側オトガイ舌筋枝 (Br. Tong) 切断モデル

③片側オトガイ舌筋枝 (Br. Mand と Br. Tong) 切断モデル

④両側オトガイ舌筋枝 (Br. Mand) 切断モデル

⑤両側オトガイ舌筋枝 (Br. Tong) 切断モデル

⑥両側オトガイ舌筋枝 (Br. Mand と Br. Tong) 切断モデル

なお、これらのモデルラットは各8匹作製した。

(2) オトガイ舌骨筋支配神経切断モデルの作製

(1) と同様に、手術用顕微鏡下で下顎骨内側から鎖骨に至る皮膚切開を加えて、咬筋および下顎骨を明示する。顎二腹筋前腹・後腹を剖出し、内側に翻転後、顎舌骨筋を切断し、舌下神経本幹と頸神経ワナ、オトガイ舌骨筋枝を確認した。オトガイ舌骨筋の2重支配で副交感神経は頸神経ワナを経由することから (Exp. Brain Res., 2003)、体性運動ニューロンと副交感神経の両者を切断するオトガイ舌骨筋枝切断モデルと、副交感神経のみを切断する頸神経ワナ切断モデルを、以下の条件で作製した。

① 片側オトガイ舌骨筋枝切断モデル

② 両側オトガイ舌骨筋枝切断モデル

③ 片側頸神経ワナ切断モデル

④ 両側頸神経ワナ切断モデル

なお、これらのモデルラットは各8匹作製した。

(3) オトガイ舌筋・オトガイ舌骨筋両支配神経切断モデルの作製

以下の条件で、オトガイ舌筋枝・オトガイ舌骨筋両支配神経の切断モデルを作製した。

①片側オトガイ舌筋枝・オトガイ舌骨筋両支配神経の切断モデル

②両側オトガイ舌筋枝・オトガイ舌骨筋両支配神経の切断モデル

なお、これらのモデルラットは各8匹作製した。

上述のすべてのモデルラットとコントロールラットについて、舌の運動様相、呼吸状態に加えて摂食・嚥下の量、回数時間などの行動様式の変化について観察した。

実験2. モデルラットの中樞神経の形態学的経時変化

実験1のモデルラット群とコントロール群を、飼育3日、10日、20日、30日に分類した。Tiopental 0.5mg/gの腹腔内投与による浸麻酔下で、灌流固定(4% paraphormaldehyde - 0.5% glutaraldehyde - 0.1 M phosphate buffer)を行い、脳幹および上部脊髄を摘出する。クライオスタットにて舌下神経核を含むレベルの凍結横断連続切片を作製した。0.3%過酸化水素水による内因性ペルオキシダーゼの除去と、10% Sheep serumによる抗体の非特異反応を阻害する前処理の後、Rabbit anti-substance P polyclonal antibodyを1次抗体とする一連の免疫組織化学染色を行った。Diaminobenzidineによって可視化し、スライドガラスに切片を貼付し、ニュートラルレッドで対比染色を行った。

光学顕微鏡下で舌下神経核の、①呼吸リズムに同期して活動するオトガイ舌筋運動ニューロン (IGGm)の局在領域、②オトガイ舌骨筋の副交感神経節前ニューロンの局在領域、③オトガイ舌骨筋体性運動ニューロン領域について、サブスタンスP陽性軸索終末の分布様相およびサブスタンスPの受容体(NK1受容体)の発現について観察した。画像をコンピューターに取り込み、飼育期間(3日、10日、20日、30日)ごとに、モデルラット群とコントロール群でサブスタンスP陽性軸索終末の分布量およびNK1受容体の発現様相について比較・解析するとともに、運動ニューロンの局在様相についても比較した。

実験3. モデルラットの中樞神経の機能変化

実験に供したラットの一部は電気生理学的検討に用いた。生脳幹スライス標本作製し、酸素飽和人工脳脊髄液を灌流した、記録チャンバー内に固定した。パッチクランプ法にてモデルラット群とコントロール群の運動ニューロンの生理特性を比較した。

4. 研究成果

実験1. オトガイ舌筋あるいはオトガイ舌骨筋支配神経切断モデルラットによる行動実験

(1) オトガイ舌筋支配神経切断モデルの比

較

- ①片側オトガイ舌筋枝 (Br. Mand) 切断モデル
- ②片側オトガイ舌筋枝 (Br. Tong) 切断モデル
- ③片側オトガイ舌筋枝 (Br. Mand と Br. Tong) 切断モデル
- ④両側オトガイ舌筋枝 (Br. Mand) 切断モデル
- ⑤両側オトガイ舌筋枝 (Br. Tong) 切断モデル
- ⑥両側オトガイ舌筋枝 (Br. Mand と Br. Tong) 切断モデル

上記モデルラット群すべてにおいて、飼育3日までは、コントロールラット群と比べて舌運動の減少や摂食量の減少がみられたが、手術侵襲によるものと考えられた。飼育10日では①～③の片側切断群ではコントロールラット群と比べて有意な差は見られなかったが、④～⑥の両側切断群では、呼吸数では平均10%増加、摂食量では平均15%減少していた。なお、飼育20日以降では、全群間において有意な差は認められなかった。

(2) オトガイ舌骨筋支配神経切断モデルの比較

- ①片側オトガイ舌骨筋枝切断モデル
- ②両側オトガイ舌骨筋枝切断モデル
- ③片側頸神経ワナ切断モデル
- ④両側頸神経ワナ切断モデル

(1)と同様に上記モデルラット群すべてにおいて、飼育3日までは、コントロールラット群と比べて摂食量の減少等がみられたが、手術侵襲によるものと考えられた。飼育10日以降では、全群間において有意な差は認められなかった。

(3) オトガイ舌筋・オトガイ舌骨筋両支配神経切断モデルの比較

- ①片側オトガイ舌筋枝・オトガイ舌骨筋両支配神経の切断モデル
- ②両側オトガイ舌筋枝・オトガイ舌骨筋両支配神経の切断モデル

①については飼育10日ですでにコントロールラット群との有意な差は認められなかった。②については飼育20日でも呼吸動態の変化や摂食量の減少が見られ、飼育30日でコントロールラット群と同様のレベルに回復した。

以上の結果より、オトガイ舌筋あるいはオトガイ舌骨筋支配神経の切断により、一過性に呼吸動態や、摂食に影響を与えることがあ

るが、一定の期間を経て、回復あるいは順応することが示唆された。

実験2. モデルラットの中樞神経の形態学的経時変化

モデルラット群とコントロール群を、飼育3日、10日、20日、30日に分類し、中樞神経の経時変化について形態学的な観察を行った。その結果、神経切断後、経時的に神経細胞数が減少し、それに伴ってサブスタンスP陽性軸索終末分布量も減少する傾向がみられた。すべてのモデルラットにおいて、飼育30日でも神経細胞数や軸索終末分布量の回復傾向は認めなかった。

3. モデルラットの中樞神経の機能変化

パッチクランプ法にてモデルラット群とコントロール群の運動ニューロンの生理特性を比較した。その結果、両運動ニューロン間では、生理学的特性に変化はあらわれないことが明らかとなった。

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4件)

- ① Umemura T, Yasuda K, Ishihama K, Yamada H, Okayama M, Hasumi-Nakayama Y, Furusawa K, A comparison of the postnatal development of muscle-spindle and periodontal- ligament neurons in the mesencephalic trigeminal nucleus of the rat. *Neuroscience Letters*, 査読有, 473, 2010, 155-157
- ② Yamanishi T, Takao K, Koizumi H, Ishihama K, Nohara K, Komaki M, Enomoto A, Yokota Y, Kogo M. Alpha2-adrenoceptors coordinate swallowing and respiration. *J Dent Res.*, 89, 2010, 258-263.
- ③ Okamoto R, Enomoto A, Koizumi H, Tanaka S, Ishihama K, Kogo M. Long-term potentiation of intrinsic excitability in trigeminal motoneurons. *Brain Res.*, 1312, 2010, 32-40.
- ④ Koizumi H, Nomura K, Yokota Y, Enomoto A, Yamanishi T, Iida S, Ishihama K, Kogo M. Regulation of trigeminal

respiratory motor activity in the
brainstem. J Dent Res., 88, 2009,
1048-53.

[学会発表] (計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古澤 清文 (FURUSAWA KIYOFUMI)
松本歯科大学・大学院歯学独立研究科・
教授
研究者番号：90165481

(2) 研究分担者

安田 浩一 (YASUDA KOUICHI)
松本歯科大学・大学院歯学独立研究科・
准教授
研究者番号：30230220

中山 洋子 (NAKAYAMA YOKO)
松本歯科大学・歯学部・講師
研究者番号：30308647

石濱 孝二 (ISHIHAMA KOHJI)
松本歯科大学・歯学部・講師
研究者番号：30432454

森 亮太 (MORI RYOTA)
松本歯科大学・歯学部・講師
研究者番号：50298410

田中 晋 (TANAKA SUSUMU)
大阪大学・歯学研究科(研究院)・助教
研究者番号：00367541

富田 郁雄 (TOMITA IKUO)
松本歯科大学・歯学部・助教
研究者番号：00410423

楊 淑華 (YANG SHU HUA)
松本歯科大学・歯学部・助教
研究者番号：80360220

梅村 哲弘 (MEMURA TETSUHIRO)
松本歯科大学・歯学部・助手
研究者番号：70460441

山田 秀史 (YAMADA HIDEFUMI)
松本歯科大学・歯学部・助手
研究者番号：60513174

宮下 みどり (MIYASHITA MIDORI)
松本歯科大学・歯学部・助手

研究者番号：20513154

伊藤 香那 (KANA ITO)
松本歯科大学・歯学部・助手
研究者番号：40549375

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

