

令和 3 年 5 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K11834

研究課題名(和文) 嚥下中枢に対する5-HTとサブスタンスPによる2相性制御機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of biphasic control mechanism by 5-HT and substance P for swallowing central pattern generator

研究代表者

山西 整 (Yamanishi, Tadashi)

大阪大学・歯学研究科・招へい教員

研究者番号：20397780

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：嚥下中枢の中樞神経機構はあまり多くのことが分かっていない。本研究では、嚥下中枢を限局して分析するために、嚥下活動を発現できる最小の延髄スライス標本の作成を第一の目的とした。さらに、この最小の延髄スライス標本を用いて、嚥下活動を形成するために必須となる主要な興奮性神経伝達物質受容体を明らかにすることを第二の目的とした。

生後2日の新生仔ラットの延髄を抽出し、迷走神経と舌下神経を含む厚さ0.8mmのスライスから嚥下活動を誘発することができた。これ以上薄いスライスでは嚥下活動を発現することができなかった。この標本を用いて、嚥下活動の興奮性シグナル伝達は主にNMDA受容体が担っていることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

嚥下活動は、呼吸と食物輸送のスイッチを担う複雑な反射運動である。この障害によって引き起こされる誤嚥性肺炎は、本邦の死因第7位であり、超高齢化を迎えたわれわれの社会において重大な問題である。しかしながら嚥下中枢の中樞神経機構は、あまり多くのことがわかっていない。本研究ではまず、嚥下中枢を選択的に分析するための実験標本を作成した。このような標本の報告はこれまでになく、科学的に嚥下中枢にアプローチするための新しい手法となった。この新たなアプローチを用いて、嚥下中枢内の主な興奮性シグナル伝達はNMDA受容体が担うことを確認できた。以上の結果は嚥下中枢の神経ネットワークを解明するために大きな意味を持つ。

研究成果の概要(英文)：Not much is known about the central nervous system of the swallowing central pattern generator (CPG). The primary purpose of this study was to prepare the smallest medulla oblongata slice preparation capable of expressing swallowing activity in order to analyze swallowing CPG. Furthermore, using this preparation, the second purpose was to clarify the major excitatory neurotransmitter receptors that are essential for the formation of swallowing activity. The medulla oblongata of a 2-day-old newborn rat was extracted, and swallowing activity could be induced from a 0.8 mm-thick slice containing the vagus nerve and the hypoglossal nerve. Swallowing activity could not be expressed with thinner slices. Using this slice, it was clarified that the excitatory signaling of swallowing activity is mainly borne by the NMDA receptor.

研究分野：顎口腔機能の神経科学

キーワード：嚥下活動 嚥下中枢 延髄スライス標本 NMDA受容体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

嚥下活動は、上気道において呼吸と食物輸送のスイッチを担う複雑な反射運動であり、生命維持に非常に重要な運動である。嚥下活動の障害により引き起こされる誤嚥性肺炎は、本邦の死因第7位であり、超高齢化を迎えたわれわれの社会において重大な問題である。このように重要な嚥下活動であるが、その複雑な協調運動がプログラムされている中枢神経機構については、あまり多くのことが知られていない。

嚥下活動は、延髄孤束核 (nucleus tractus solitarius; NTS) に存在するセントラルパターンジェネレーター (central pattern generator; CPG) においてその活動パターンが形成される。迷走神経および舌咽神経から伝達される求心性シグナルは、NTS とその周辺に存在する嚥下中枢のトリガーを担う細胞へ投射する。この神経細胞は興奮性アミノ酸である N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) 感受性であるとともに、NTS 周辺の外側網様体から γ -aminobutyric acid (GABA) やグリシンによる抑制性制御を受けていることが知られている。しかしながら、嚥下 CPG 内における神経ネットワークのアーキテクチャーは不明である。また CPG 内の主要な興奮性または抑制性伝達を担う神経伝達物質受容体についても多くは知られていない。

これまで当研究室では、新生仔ラット延髄 en bloc 標本や若年ラット in situ 標本といった実験標本を用いて、嚥下活動を形成または修飾する中枢神経機構の一端を明らかとてきた。しかし、脳幹内の神経ネットワークが比較的広い範囲で保たれているこれらの標本は、嚥下 CPG に対する修飾機構も多く温存されていることから、得られた結果の解釈に多様性を残すという問題があった。

2. 研究の目的

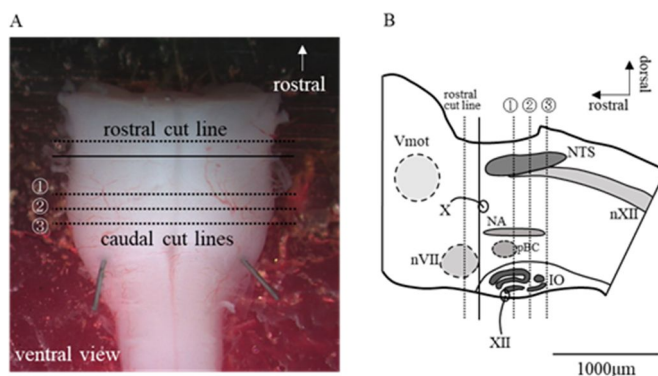
上記の背景から、本研究では嚥下 CPG の神経機構をより限局して研究対象とするために、嚥下活動を発現し得る最小の延髄スライス標本を作成することを第一の目的とした。このような研究はこれまでになされていなかったため、本研究結果は嚥下 CPG 仮説に対する確認ともなる。さらに、確立した最小の延髄スライス標本を用いて、嚥下活動を形成するために必須となる主要な興奮性神経伝達物質受容体を明らかにすることを第二の目的として研究を行った。

3. 研究の方法

本研究における実験は、大阪大学大学院歯学研究科動物実験委員会の規定 (動物実験委員会承認番号: 動歯-22-016-0) と動物の愛護及び管理に関する法律を順守して行った。

延髄スライス標本の作成

実験には、生後 2 日齢 Sprague-Dawley 系ラットを用いた。イソフルラン (和光純薬工業) を用いて十分に麻酔を行った後、最尾側肋骨下で下半身を切断し、前頭縫合で前頭部分を切除した直後に、4℃ に冷却し 95% O₂・5% CO₂ 混和ガスで飽和させた人工脳脊髄液内に浸透した。その後、頭蓋骨を除去し、四丘体上丘より吻側で大脑を除去した。続いて標本の背側より脊椎骨を除去し脊髄を剖出した。脳幹は、小脳を除去した後、その直下に存在する菱形窩正中溝、顔面神経丘、第四脳室髄條を明示した。



脳幹表面から出現する迷走神経および舌下神経を周囲骨組織から切離し、できるだけ長く脳幹組織に残すようにした。脳幹組織表面に残存する硬膜を除去した後に、脳幹ブロックを一塊にして摘出した。脳幹腹側は、脳幹腹側表面の脳底動脈およびその枝を硬膜とともに除去した後、舌下神経および迷走神経を損傷しないようにそれぞれの周囲に残存する硬膜を除去した。舌下神経は、脳幹ブロックの腹側表面から左右それぞれ吻尾側方向に 6 本程度出現するが、それらの内最吻側側に出現する左右 1 対の神経束のみ残した。続いて、摘出した脳幹ブロックをマイクロスライス用チャンバーにピン固定した。マイクロスライス作成装置を用いてスライス標本を作成した。迷走神経が出現するレベルから 100 μm 吻側の位置をこのスライスの吻側切断面とし、そこから尾側へ 600-800 μm の 100 μm ごとに尾側切断面を設定し、1 個体から 1 枚の延髄スライス標本を作成した (上図)。

神経活動の記録

記録用チャンバー (RC-26GLP, Warner Instruments) をステージ固定式正立顕微鏡 (Axio Examiner D1, Carl Zeiss) のステージ上に設置し、室温下 (23~25℃) で人工脳脊髄灌流液を 3ml/min の

速度で灌流した。延髄スライス標本を記録用チャンバーに静置し、スライスアンカーにて固定した。神経活動の記録は、先端径が 0.15-0.2mm に調節された人工脳脊髄灌流液で満たしたガラスピペット (200EA/PKG、外径 1.2mm×内径 0.68mm) をサクシオンエレクトロードに固定したガラス吸引電極を用いて、延髄スライス標本上の片側の舌下神経を吸引することによって行った。記録したシグナルは、アンプリファイアーにて増幅し (High-cut filter 10kHz、Low-cut filter 300Hz)、AD コンバーターを通し、専用のソフトウェアを用いて記録し解析を行った。延髄スライス標本を作成する際は、人工脳脊髄灌流液の組成を 124 NaCl、25 NaHCO₃、3.0 KCl、1.5 CaCl₂、1.0 MgSO₄、0.5 NaH₂PO₄、11 glucose (mM) (和光純薬工業) とし、神経活動の記録の際は、呼吸活動を記録するために KCl の濃度を 8.0mM とした。

嚙下活動の誘発

嚙下活動を誘発するために以下の 2 つの方法を用いた。延髄スライス標本に温存した迷走神経に対する電気刺激と、延髄スライス標本内の NTS へ GABA_A 受容体拮抗薬である Bicuculline ((-)-Bicuculline methiodide; BIC、フナコシ) を局所微量投与する方法である。いずれの誘発刺激も、記録を行う舌下神経と同側の迷走神経または片側 NTS に対して行った。

迷走神経への電気刺激：先端径が 0.2-0.3mm に調節し、人工脳脊髄液で満たしたガラスピペットを用いてスライス標本に温存した迷走神経に対して電気刺激を行った。刺激にはエレクトリカルスティミュレーターを用い、電気刺激強度は 5.0V、刺激時間 1ms、刺激頻度は 50Hz とし、一部の実験では単発刺激 (刺激強度 5.0V、刺激時間 1ms) とした。

薬剤投与実験

嚙下活動を発現するために必須となる興奮性神経伝達物質の受容体を調べる目的で、non-NMDA 受容体拮抗薬である CNQX (6-Cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione; CNQX、abcam) または、NMDA 受容体拮抗薬である D-AP5 (D-(-)-2-Amino-5-phosphonopentanoic acid; AP5、abcam) を、10 μM となるように人工脊髄灌流液に投与し、投与前後での嚙下活動の変化を調べた。嚙下活動の誘発は迷走神経の電気刺激によって行った。薬剤投与後の評価は、薬剤投与後少なくとも 10 分以上経過した後に行った。薬剤投与前後の検討項目は、呼吸活動および嚙下活動の神経活動時間の変化、神経活動の最大振幅の変化、嚙下活動発現頻度の変化、呼吸間隔の変化とした。

延髄スライス標本の評価

実験終了後に 600-800 μm の厚さの延髄スライス標本を 10%中性緩衝ホルマリン液 (和光純薬工業) にて固定し、正立顕微鏡 (Leica DM2000、Leica) で観察した。

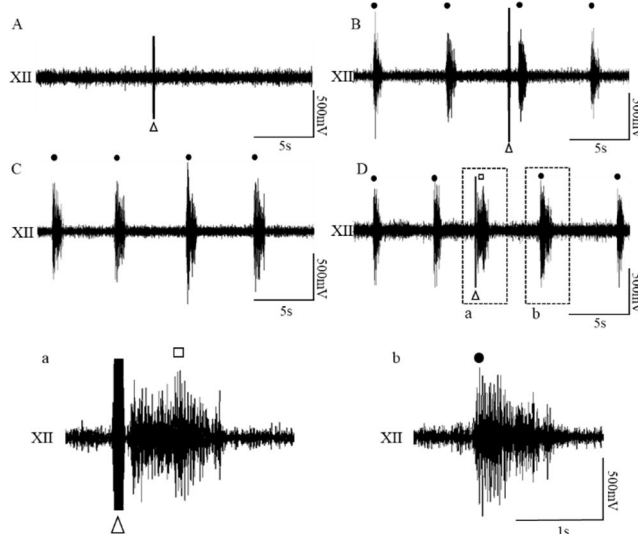
統計処理

データは平均 ± 標準偏差の形で表示した。二群間の有意差検定は Student's t-test を用い、有意水準は 5% とした。

4. 研究成果

延髄スライス標本からの嚙下活動の誘発

標本作成で示した図に示したように、延髄側面から出現した左右の迷走神経知覚枝の吻側端を結ぶレベルから吻側へ 100 μm の位置を吻側切断面と設定し、そこから尾側へ 600 μm (上図点線、n=10)、700 μm (上図点線、n=10) または 800 μm (上図点線、n=26) の厚さで作成したスライス標本の舌下神経より記録された神経活動を右図に示す (スライス厚さ 600 μm; 右図 A、厚さ 700 μm; 右図 B、厚さ 800 μm; 右図 C および D)。600 μm の厚さのスライス標本からは、安静時においても、また迷走神経への電気刺激を行った後も神経活動は記録されなかった (A)。700 μm の厚さのスライス標本は、安静時に自発的な周期性の呼吸活動を示した (B)。しかし、迷走神経への電気刺激によって神経活動を誘発することはできなかった。800 μm の厚さのスライス標本では、安静時に自発的な呼吸活動を認めた (C) ことに加え、迷走神経への電気刺激によって (D) 呼吸活動とは異なる波形を示す神経活動が誘発された (右図 a、b)。このスライス標本から記録された。

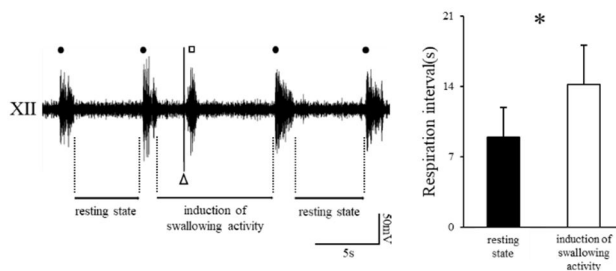


呼吸活動と迷走神経への刺激反応性の活動を比較すると、活動時間は迷走神経刺激反応性の活動において有意に大きく (呼吸活動; $0.7 \pm 0.1s$ 、迷走神経刺激反応性活動; $1.3 \pm 0.3s$, $n=13$ 、

p < 0.05) さらに活動パターンの特徴として、活動時間に対する最大振幅に到達するまでの時間の割合を見ると、呼吸活動が $16.9 \pm 6.9\%$ であったのに対して迷走神経刺激反応性活動は $51.1 \pm 4.3\%$ と、統計学的有意差を認めた (n=13, p < 0.05)。これは、呼吸活動は漸減型活動パターン (rapidly peaking-slowly decrementing pattern) であるのに対し、迷走神経刺激反応性の活動は漸増型活動パターン (slowly peaking-slowly decrementing pattern) の特徴を持つことを示す結果であった。これまで当研究室において、新生仔ラット延髄 en bloc 標本および若年ラット in situ 標本の迷走神経へ電気刺激を行うことによって誘発された活動が嚥下活動であることを確認してきたが、今回の研究における延髄スライス標本から誘発された神経活動の活動パターンはこれらの標本から誘発された嚥下活動の活動パターンと同様であった。

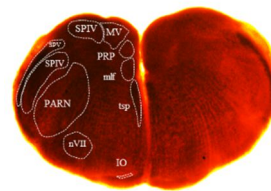
次に、迷走神経への電気刺激によって舌下神経から誘発された神経活動が嚥下活動であることを確認する目的で、この電気刺激誘発性の活動による呼吸活動の活動間隔の延長について検討した。

厚さ $800 \mu\text{m}$ の延髄スライス標本から嚥下活動を誘発すると、周期性呼吸活動の活動間隔の延長を認めた (右図)。安静時の呼吸活動の活動間隔と、嚥下活動が発現した時の呼吸活動の活動間隔を比較すると、嚥下活動が発現した時の呼吸活動の活動間隔の有意な延長を認めた (安静時呼吸間隔: $8.9 \pm 3.0\text{s}$ 、嚥下発現時呼吸間隔: $14.2 \pm 3.9\text{s}$ 、n=10, p < 0.05)。



延髄スライス標本の解剖学的検討

本研究にて得られた延髄スライス標本表面の顕微鏡写真を右図に示す。2日齢のSDラットを用いた場合、吻側切断面から尾側へ $800 \mu\text{m}$ の位置は Area Postrema (AP) にほぼ一致した。新生仔ラット中枢神経の解剖学書を参照し、スライス標本の切断面を観察した結果、図に示すような神経核が観察された。(これらの切断面は、最初に示した図内における矢状面シェーマにおける切断面と一致している。)



薬剤投与による嚥下活動の変化

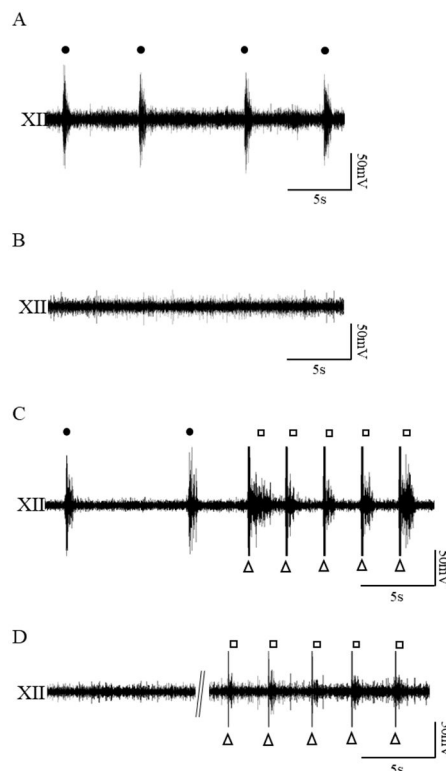
延髄スライス標本において、嚥下活動を発現するための主要な興奮性神経伝達に関わる受容体を検討する目的で、non-NMDA受容体の拮抗薬である CNQX および NMDA受容体の拮抗薬である AP5 の投与前後における、迷走神経への電気刺激で誘発した嚥下活動の変化を検討した。

$800 \mu\text{m}$ の厚さの延髄スライス標本へ CNQX ($10 \mu\text{M}$) を投与することにより、自発的な呼吸活動が消失した (右図 A から B への変化)。スライス標本から得られた自発的な呼吸活動が CNQX によって完全に抑制されることは良く知られている。

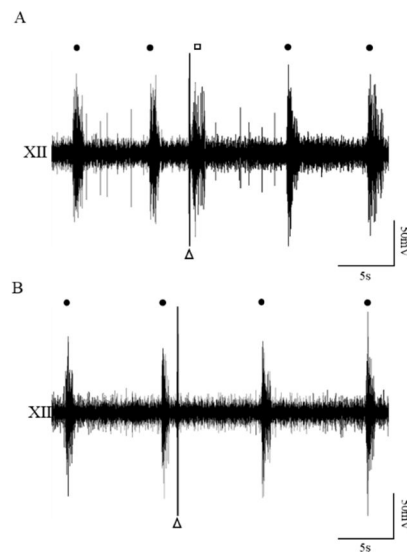
一方、迷走神経への電気刺激によって誘発した嚥下活動は (右図 C) CNQX の投与によって抑制はされたものの、完全に消失することはなかった (右図 D)。

CNQX 投与前後での嚥下活動の変化を比較すると、活動時間 (投与前: $1.3 \pm 0.2\text{s}$ 、投与後: $0.6 \pm 0.2\text{s}$ 、n=6, p < 0.05) 最大振幅 (投与前: $46.0 \pm 12.2\text{mV}$ 、投与後: $26.7 \pm 4.9\text{mV}$ 、n=6, p < 0.05) 刺激に対する嚥下活動の発現率 (投与前: $77.8 \pm 9.2\%$ 、投与後: $50.3 \pm 21.2\%$ 、n=6, p < 0.05) いずれも CNQX の投与によって有意に減少したが、嚥下活動の発現は残存した。

次に AP5 ($10 \mu\text{M}$) を投与すると (次ページの右図) 呼吸活動に著明な変化は認めなかった一方で、迷走神経への電気刺激による嚥下活動の誘発は完全に抑制された。嚥下活動の変化を比較すると、呼吸活動については AP5 投与前後で活動時間 (投与前: $0.8 \pm 0.1\text{s}$ 、投与後: $0.8 \pm 0.1\text{s}$ 、n=5, p=0.9) 最大振幅 (投与前: $62.5 \pm 19.9\text{mV}$ 、投与後: $62.4 \pm 18.1\text{mV}$ 、n=5, p=0.9) 共に有意差は認めなかった。一方で、AP5 投与後は嚥下活動の発現が完全に抑制された (投与前: $77.3 \pm 5.1\%$ 、投与後: 0% 、n=5) さら



に、AP5 投与前後における呼吸活動の活動間隔を計測すると、AP5 投与前における迷走神経への電気刺激によって嚥下活動が発現した時は呼吸活動の活動間隔が延長した(安静時呼吸活動の活動間隔: $8.4 \pm 1.0s$ 、嚥下発現時の呼吸間隔: $12.9 \pm 1.5s$ 、 $n=5$ 、 $p < 0.05$)のに対し、AP5 を投与することによって嚥下活動の発現をブロックした状態で同じ迷走神経刺激を加えた場合には呼吸活動の活動間隔の延長は認めなかった(安静時呼吸活動の活動間隔: $9.6 \pm 1.5s$ 、迷走神経刺激を行った時の呼吸間隔: $9.7 \pm 1.8s$ 、 $n=5$ 、 $p=0.9$)。



本研究により、安定した嚥下活動を誘発し得る延髄スライス標本を作成することに成功した。この延髄スライス標本は、生後 2 日目の SD ラットでは厚さが $800 \mu m$ であり、この中に嚥下活動を誘発するための求心性回路、嚥下活動を形成するためのパターン形成回路、出力のための遠心性回路が最小限に温存されていると考えられた。これまでこのような標本の報告はなく、嚥下中枢の神経機構を解明する上で新しいアプローチを確立することができた。

さらに、本スライス標本に NMDA 受容体の拮抗薬を投与することによって、自発的な呼吸活動と刺激誘発性の嚥下活動を分離できることが明らかとなった。加えて、嚥下活動を形成するための興奮性シグナル伝達は主に NMDA 受容体が担っていることを確認することができた。

引用文献

Kessler JP, Jean A.(1991): Evidence that activation of N-methyl-D-aspartate (NMDA) and non-NMDA receptors within the nucleus tractus solitarii triggers swallowing. *Eur J Pharmacol.* 201(1):59-67

Yamanishi T, Takao K, Koizumi H, Ishihama K, Nohara K, Komaki M, Enomoto A, Yokota Y, Kogo M.(2010): Alpha2-adrenoceptors coordinate swallowing and respiration. *J Dent Res.* 89(3):258-63

Yamanishi T, Koizumi H, Komaki M, Ishihama K, Adachi T, Enomoto A, Takao K, Iida S, Kogo M.(2008): Possible involvement of neurons in locus coeruleus in inhibitory effect on glossopharyngeal expiratory activity in a neonatal rat brainstem-spinal cord preparation in vitro. *Neurosci Res.* 60(1):2-9

Kogo M, Yamanishi T, Koizumi H, Matsuya T.(2002): Swallowing-like activity elicited in vitro in neonatal rat organ attached brainstem block preparation. *Brain Res.* 955(1-2):24-33

青海哲也.(2013): ラット working heart-brainstem preparation を用いた嚥下運動の解析. 2013 年 3 月学位論文

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Harada T, Yamanishi T, Kurimoto T, Nishio J.	4. 巻 30(1)
2. 論文標題 Improved Quality of Life for Children With Beckwith-Wiedemann Syndrome Following Tongue Reduction Surgery.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Craniofacial Surgery	6. 最初と最後の頁 163-166
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/SCS.0000000000004823.	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 該当する

1. 著者名 Kurimoto T, Yamanishi T, Harada T, Matsuoka K, Uematsu S, Yamamoto Y, Arimura Y, Togawa T, Inoue N, Nishio J.	4. 巻 31(1)
2. 論文標題 Differential diagnosis of ameloblastic fibro-odontoma: case report and literature review.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Oral and Maxillofacial Surgery	6. 最初と最後の頁 38-42
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ajoms.2018.07.001	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 該当する

1. 著者名 Masahata K, Soh H, Tachibana K, Sasahara J, Hirose M, Yamanishi T, Ibuka S, Okuyama H, Usui N.	4. 巻 35(8)
2. 論文標題 Clinical outcomes of ex utero intrapartum treatment for fetal airway obstruction.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pediatric Surgery International	6. 最初と最後の頁 835-843
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00383-019-04494-1	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 該当する

1. 著者名 Takayuki Kurimoto, Tadashi Yamanishi, Takeshi Harada, Keiko Matsuoka, Setsuko Uematsu, Yuri Yamamoto, Yuki Arimura, Takeshi Togawa, Naoko Inoue, Juntaro Nishio	4. 巻 31
2. 論文標題 Differential diagnosis of ameloblastic fibro-odontoma: case report and literature review	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology	6. 最初と最後の頁 38-42
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ajoms.2018.07.001	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 西尾崇弘、山西整、近藤敬秀、外川健史、青海哲也、横田祐介、原田文司、古郷幹彦
2. 発表標題 新生仔ラット延髄スライス標本を用いた嚙下活動に対するセロトニンの中枢作用の検討
3. 学会等名 第75回 日本口腔科学会学術大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔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
研究 分担者	青海 哲也 (Seikai Tetsuya) (40713194)	北海道大学・大学病院・助教 (10101)	

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
---------	---------