

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K10136

研究課題名（和文）不確縫線核ネットワークによる呼吸と嚥下の共制御メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of co-control mechanism of respiration and swallowing by uncertain raphe nucleus network

研究代表者

山西 整 (Yamanishi, Tadashi)

大阪大学・大学院歯学研究科・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） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は不確縫線核ニューロンがセロトニン受容体とサブスタンスP受容体を介して呼吸活動と嚥下活動の発現閾値を制御する中枢制御メカニズムを明らかにすることを目的とした。生後3週令の若年ラットを用いて脳内の広い範囲のネットワークが機能的に温存される「in situ標本」を作製し、上喉頭神経に対する電気刺激によって刺激反応性の活動を誘発することに成功した。この活動は咬筋、顎二腹筋、咽頭収縮筋、および上部食道筋の一定の順にシークエンシャルに筋活動を示し、この連続性は嚥下活動と一致した。本標本に対する薬剤投与実験によって延髄内の5-HT受容体が嚥下活動の発現閾値と筋活動に影響を及ぼす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

嚥下活動の障害が原因となる誤嚥性肺炎は、本邦の死因第6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神経機構の解明はあまり進んでいない。本研究では、嚥下中枢を選択的に分析するためのin situ実験標本を作成し、嚥下活動を誘発することに成功した。このアプローチを用いて、延髄内のセロトニン受容体が嚥下活動の発現閾値や筋活動に影響を及ぼすことを明らかにした。以上の研究は嚥下活動の中枢神経メカニズムを明らかにする新たな成果となった。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study is to reveal the central mechanism by which neurons in the medullary raphe nucleus, which co-produce substance P (SP) and serotonin (5-HT), control respiratory and swallowing activities. Using juvenile rats aged 3 weeks, we developed in situ preparation, in which a wide range of neural networks within the brainstem were functionally preserved, and successfully induced stimulus-responsive activity by electrical stimulation of the superior laryngeal nerve. This activity showed sequential muscle activities, including the masseter muscle, digastric muscle, pharyngeal constrictor muscle, and upper esophageal muscle in a certain order. This sequence was consistent with swallowing activity. With drug administration experiments, we found that 5-HT receptors in the medulla oblongata raise the threshold of swallowing activity and affect continuous muscle activity.

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 呼吸活動 in situ 標本 セロトニン受容体

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

嚥下とは、口腔内に取り込まれた水分や食物を、咽頭・食道を経て胃に送り込む反射運動であり、この運動が障害されると、栄養不良・脱水・誤嚥を引き起こすだけでなく、口から食べる喜びや社会生活の質を低下させる。特に、誤嚥性肺炎は嚥下障害が主な原因であり、超高齢化社会を迎えた本邦において、大きな社会問題となっている。しかし嚥下活動を形成する中枢神経内の神経ネットワークをターゲットとした治療法は存在しない。その理由として嚥下活動を形成する中枢神経メカニズムは、ほとんど解明されていない事が一因として挙げられる。

嚥下活動は、口腔・咽頭・喉頭・食道の多数の筋が決められた順序で活動する、再現性のある活動であり、その活動パターンは延髄孤側核 (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) によってプログラムされている。しかしながら、このような中枢神経ネットワークの詳細はほとんど知られていない。この原因として、これまでの研究で用いられている *in vivo* や *awake* 動物に対して選択できる実験アプローチの限界が挙げられる。Working heart-brainstem preparation (*in situ* 標本) は、体外循環を行うことによって、脳幹内の神経ネットワークを広い範囲で機能的に温存することができる実験系である。低 O₂ や高 CO₂ といった外環境の変化に反応して *in vivo* 実験標本が示す呼吸モードの変化を正確に再現することから、*in vivo* 実験条件に極めて類似した実験環境を得ることができる。加えて、本標本では体外循環を行うため、実験コンディションが標本の循環動態や生命維持に影響されない。このために、*in vivo* 実験系や *awake* 動物に対して選択することが困難であった様々な薬理学的アプローチが可能となる。

2. 研究の目的

上記の背景から、本研究ではまず *in situ* 標本を用いて安定した嚥下活動を誘発し得る実験条件を確立した上で、次に中枢神経内のセロトニン受容体が嚥下活動に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

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。

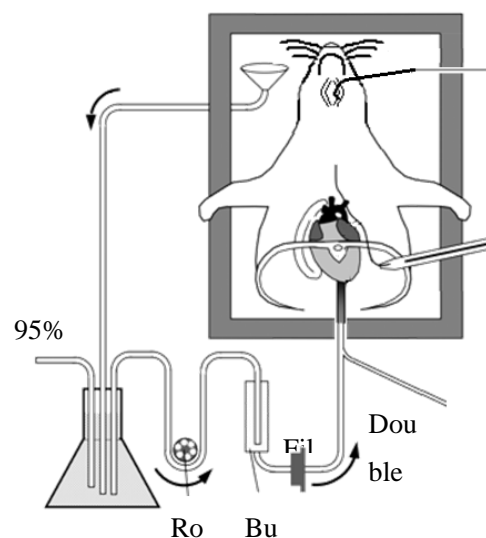
(1) *In situ* 標本の作製

実験には、生後 21-30 日齢 Sprague-Dawley 系ラットを用いた。ハロタン(フローセン、武田薬品工業株式会社)を用いて十分に麻酔を行った後、横隔膜下で下半身を切除し、4℃に冷却した人工脳脊髄灌流液内で、前四丘体より吻側で除脳を行った。横隔膜を除去する際に横隔神経および下行大動脈を剖出し、下行大動脈にはダブルルーメンカニューレ(18G、COVIDIEN)を挿入し縫合固定した。レコーディングチャンバーに標本を移動し、95%O₂・5%

CO₂ の混和ガス(大協物産)で飽和し、恒温器 (TR-1A、AS ONE)にて 31°C に調整し、バブルトラップおよびフィルター (pore size: 40μm, Millipore)を通した人工脳脊髄灌流液を、マイクロチューブポンプ (MINIPLUS3、GILSON)を用いて毎分 20–28ml の速度で灌流した。ダブルルーメンカテーテルのもう一方には灌流圧測定器 (MLT0670, AD Instrument)を接続し、持続的に灌流圧の測定を行った。

作製した標本を実験に用いる前に、全ての標本について人工脳脊髄灌流液内にバソプレシン 1.0~1.2nM(ピトレシン注射液、Pfizer)を投与すると共に灌流液の灌流スピードを調節すること

によって、灌流圧が 60–80mmHg となるようにし、その結果、標本の横隔神経より記録された自発的呼吸活動が、安定したリズムと漸増型の正常呼吸活動パターンを示すことを確認した。(右図)



(2) 神経・筋活動の記録

プラチナ製コーティングワイヤー(径 0.015mm、PFA-Insulated Silver Wire、A-M Systems)を目的の筋束内に留置することで筋活動を記録した。筋活動記録は咬筋、顎二腹筋、咽頭収縮筋、および上部食道筋を対象とした。神経活動の記録は、グラスピペット(外径 1.5mm×内径 1.12mm、インターメディカル)をサクションエレクトロード(Suction Electrode、A-M Systems)に固定し、横隔神経束末梢端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 (DAM50、World Precision Instruments)にて 10⁴ 倍に増幅し (High-cut filter 10kHz、Low-cut filter 1Hz)、AD コンバーター (Powerlab 4/30、AD Instruments)を通し、Labchart7 (AD Instruments)を用いてコンピューター (MDD-AGG9210X、Windows7、mouse computer)に記録し解析を行った。

(3) 嚥下活動の誘発

嚥下活動を誘発するために、過去の研究で一般的に用いられている、片側上喉頭神経 (Supra Laryngeal Nerve; SLN) に対する電気刺激を行った。標本から片側 SLN を剖出した後に切断し、マニピュレータ (BC-4、NARISHIGE) に固定した刺激電極 (双極) を遊離した SLN の断端付近に接触させ、電気刺激を加えた。電気刺激条件は単発刺激の場合は刺激強度 5.0V、刺激時間 1ms とし、連続刺激の場合は刺激強度 5.0V、刺激時間 1ms、刺激頻度は 2Hz または 1Hz とした。

(4) 薬剤投与実験

Serotonin hydrochloride (5-HT, Sigma-Aldrich)、5-HT_{1A} 受容体アゴニストである(R)-(+)-8-Hydroxy-DPAT hydrobromide (8-OH-DPAT, Sigma-Aldrich)を目的の濃度となるように人工脳脊髄灌流液に投与し、投与前後での嚥下活動の変化を調べた。加えてそれぞれの薬剤を *in situ* 標本の孤束核領域へ局所微量投与を行った。

薬剤投与実験での検討項目は以下の 2 点とした。①薬剤投与前後での、口腔、咽頭、食道における筋活動の持続時間および活動開始のタイミングの変化、②薬剤投与前後での、一定回数の連続嚥下に要する時間の変化。

薬剤投与前後での、連続嚥下の頻度および嚥下筋活動の変化について検討を行った。連続嚥下活動の頻度は、誘発された連続嚥下が 10 回となるまでの時間を計測し嚥下活動の発現頻度を算出した。

(5) 統計処理

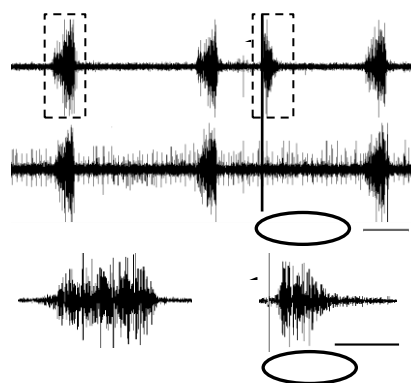
データは平均±標準誤差の形で表示した。二群間の有意差検定には Student's t-test を用い、有意水準は 5%とした。

4. 研究成果

安静時の標本からは、顎舌骨筋および横隔神経双方に同期した、約 7 秒に 1 度の安定した周期性を示す呼吸活動を認めた。呼吸活動の活動パターンは漸増型である正常呼吸パターンを示した。

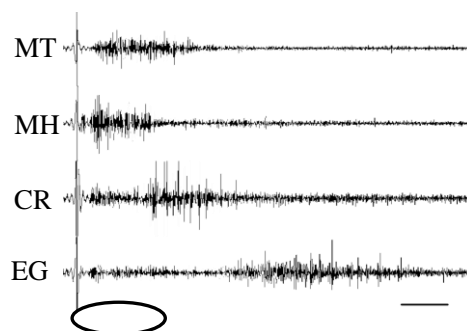
(1) WHBP からの嚥下活動の誘発

SLN への単発電気刺激を行った際の、顎舌骨筋筋電図および横隔神経活動を右図に示す。SLN へ電気刺激を行うことによって、呼吸活動とは同期しない顎舌骨筋の筋活動が認められた。また、この電気刺激反応性の筋活動パターンは、安静時の正常呼吸活動パターンとは異なり、漸減型の活動パターンを示した。



(2) 筋活動シーケンス

SLN 刺激反応性に発現する筋活動が、口腔から食道への連続した筋活動としてのシーケンスを構築することを確認するため、咬筋、顎舌骨筋、中咽頭収縮筋、上部食道筋の SLN 刺激による筋活動パターンの記録を行った。右図には各筋から記録した筋電図を示す。顎舌骨筋と咬筋の活動がピークを迎えるタイミングは近似していたのに対し、



中咽頭収縮筋の活動のピークは顎舌骨筋の活動ピークよりも約 0.4 秒遅れ、さらに上部食道筋の活動ピークは顎舌骨筋の活動ピークよりも約 0.7 秒の遅れを認めた。

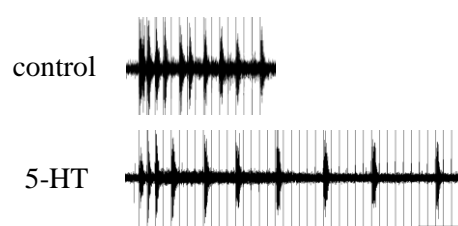
(3) 5-HT の全標本投与

5-HT (0.1 μ M) を灌流液内へ全標本投与したところ、嚥下活動の発現頻度 (Hz) は投与前 0.80 ± 0.27 Hz、投与後 0.65 ± 0.30 Hz (右図) と投与前後で統計学的な有意差を認めた。



(4) 延髄孤束核への 5-HT の局所微量投与

嚥下中枢が存在するとされる延髄孤束核をターゲットにして、5-HT (1mM) の局所微量投与を行った。連続嚥下活動の発現頻度 (右図; 投与前 0.80 ± 0.18 Hz、投与後 0.49 ± 0.14 Hz、 $p < 0.05$) は有意に増加した。これは実験 1 と同様の結果であった。



(5) 5-HT_{1A} 受容体アゴニストの全標本投与と孤束核への局所微量投与

5-HT_{1A} 受容体アゴニストである (R)-(+)-8-Hydroxy-DPAT hydrobromide を 5-HT と同様に、全標本投与および孤束核への局所微量投与を行ったところ、5-HT 投与時と同様の結果が得られた。

本研究によって、延髄内の神経ネットワークが広範囲に温存された *in situ* 標本によって嚥下活動を誘発することに成功した。本標本内の 5-HT 受容体はは上喉頭神経への電気刺激によって誘発された嚥下活動に対してその発現閾値を上昇させることが明らかとなった。さらに、これらの作用は、主に延髄背側の孤束核およびその周辺における 5-HT_{1A} 受容体を介した作用であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5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 Otsuki K, Yamanishi T, Enomoto A, Tanaka S, Kogo M, Tome W, Oonishi-Yamamoto Y, Seikai T.	4. 巻 in print
2. 論文標題 Maxillary Development and Dental Arch Relationships Following Early Two-Stage Palatoplasty: A Comparative Study.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cleft Palate Craniofac J.	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） 10.1177/10556656221129751.	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 -
1. 著者名 Kirikoshi S, Kondo T, Yamanishi T, Otsuki K, Fujibayashi E, Oonishi-Yamamoto Y, Uematsu S.	4. 巻 35
2. 論文標題 A case of glial choristoma of the tongue treated with partial resection after long-term observation.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Oral Maxillofac Surg Med Pathol.	6. 最初と最後の頁 43-47
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ajoms.2022.07.002	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 -
1. 著者名 Harada T, Yamanishi T, Kurimoto T, Uematsu S, Yamamoto Y, Inoue N, Nishio J.	4. 巻 -
2. 論文標題 Long-term Morphological Changes of the Velum and the Nasopharynx in Patients With Cleft Palate.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cleft Palate Craniofac J.	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） 10.1177/10556656211045287.	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 -
1. 著者名 Yamanishi T, Kondo T, Kirikoshi S, Otsuki K, Uematsu S, Nishio J.	4. 巻 79
2. 論文標題 Morphological Correlations in Nasolabial Formation After Primary Lip Repair for Unilateral Cleft Lip.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Oral Maxillofac Surg.	6. 最初と最後の頁 2126-2133
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.joms.2021.05.019.	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 -

1. 著者名 Yamanishi T, Otsuki K, Harada T, Kurimoto T.	4. 巻 50
2. 論文標題 Endoscope-assisted greater neurovascular palatal bundle release in cleft palatoplasty.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Oral Maxillofac Surg.	6. 最初と最後の頁 1571-1575
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ijom.2021.03.009.	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, 原田 丈司, 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嚥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NPO法人日本口腔科学会学術集会
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	近藤 敬秀 (Kondo Takahide) (90870444)	大阪大学・大学院歯学研究所・招へい教員 (14401)	

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