

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：30110

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010 ～ 2011

課題番号：22791796

研究課題名（和文） 迷走神経刺激による咀嚼筋の血流改善効果とその末梢性及び中枢性神経機構

研究課題名（英文） Neural mechanisms underlying the improvement of blood flow in the jaw muscles evoked by vagal afferent stimulation

研究代表者

石井 久淑（ISHII HISAYOSHI）

北海道医療大学・歯学部・講師

研究者番号：00275489

研究成果の概要（和文）：本研究は迷走神経の求心性刺激による咀嚼筋の血流改善効果とその末梢性及び中枢性神経機構について検討した。その結果、頸部迷走神経の求心性刺激は反射性副交感神経性血管拡張反応によるラット咬筋の血流増加を誘発し、脳幹の孤束核は咀嚼筋の血流増加に重要な役割を果たしていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：The present study examined the neural mechanisms underlying the improvement of blood flow in the masseter muscle evoked by vagal afferent stimulation. Our results indicate that cervical vagus nerve stimulation elicits the increase of blood flow in the rat masseter muscle mediated by vagal-parasympathetic reflex vasodilatation, and suggest that nucleus of the solitary tract play an important role in the blood flow increase in the jaw muscles.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	500,000	150,000	650,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,400,000	420,000	1,820,000

研究分野：口腔生理学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：副交感神経、血管拡張反応、迷走神経、孤束核、GABA 受容体、咀嚼筋、中枢神経

## 1. 研究開始当初の背景

咀嚼筋の疼痛や疲労は顎・顔面・頭部領域の機能障害（顎関節症、ブラキシズム及び頭痛など）に最も多く認められる症候であり、それらの発症機序や病態には咀嚼筋の血流障害が密接に関連していることが示唆されている（Delcanho, *Aust Prosthodont* 9: 49-59, 1995）。しかし、咀嚼筋の血流障害の詳細なメカニズムは明らかにされておらず、根治的な治療法も確立されていないのが現

状である。

我々は咀嚼筋（咬筋や顎二腹筋前腹）の神経性血流調節機序に関する一連の研究から、咀嚼筋には四肢や体幹の骨格筋には存在が認められていない副交感神経性血管拡張線維（図 1-B）が存在することを証明した（Ishii et al., *J Physiol* 569: 617-629, 2005; Sudo et al., *Brain Res* 1302: 125-131, 2009）。この血管拡張線維は三叉神経（図 1-舌神経）の求心性刺激（図 1-刺激 a）により脳幹の三

又神経脊髄路核や唾液核を介して反射的に活性化されて、咀嚼筋に顕著な血流増加を誘発する(図1D-太矢印)。したがって、この反射性血管拡張反応による血流増加作用は咀嚼筋の血流改善に応用できる可能性が示唆された。そこで、従来から中枢神経系の活性化に有効とされている迷走神経の求心性刺激とこの反射性血管拡張反応を結びつけた咀嚼筋の血流障害の新たな治療のアプローチの確立を試みた。

## 2. 研究の目的

本研究では迷走神経の求心性刺激を用いた咀嚼筋の血流改善法を確立するために必要とされる基盤的データを得ることを目的とし、1) 迷走神経の求心性刺激が咀嚼筋の血流動態及び全身の循環機能に与える影響と 2) それらに関わる末梢性及び中枢性神経機構について生理学・薬理的、生化学的及び組織学的手法を用いて検討した。

## 3. 研究の方法

### (1) 実験動物及び実験準備

実験にはWistar系雄性ラット(10-29週齢)を用いた。ラットはウレタン及び筋弛緩剤(パンクロニウム)を用いて麻酔・非動化した後、人工呼吸下にて管理した。動脈圧の測定及び薬剤注入のために、大腿動脈及び大腿静脈にカテーテルを挿入・留置した(Ishii et al., *J Physiol* 569: 617-629, 2005)。実験終了後、すべての動物はペントバルビタールの過量投与(100 mg)によって安楽死させた。

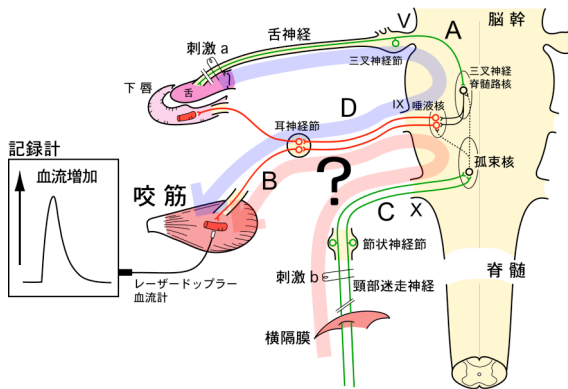


図1. 顎・顔面領域の血流調節に関与する副交感神経性血管拡張線維とそれらの中枢の模式図

(A) 三叉神経(舌神経)の電気刺激(刺激 a)で活性化される求心路、(B) 咬筋の血管を支配する副交感神経性血管拡張線維及び(C) 頸部迷走神経の電気刺激(刺激 b)で活性化される求心路。

### (2) 血流と血圧測定

両側の咬筋の血流量はレーザードップラ

ー血流計を用いて測定した(図1)。体幹血圧は大腿動脈に挿入したカテーテルから圧トランスデューサーを用いて測定した。これらは記録計を用いて経時的に記録した。

### (3) 末梢神経の電気刺激

三叉神経の第3枝の側枝である舌神経及び頸部迷走神経は中枢性に諸種の刺激強度(1-30 V)及び刺激頻度(1-30 Hz)で電気刺激した(図1-刺激 a & b)。腹部内臓諸臓器を支配する迷走神経や口腔・顔面領域に分布する交感神経線維の作用を除外するために、すべての実験に先立って両側の頸部交感神経幹と迷走神経を頸部で切断した。

### (4) 孤束核の微小電気刺激と脳内局所薬物微量注入

麻酔したラットは腹臥位にて脳定位固定装置に固定し、後頭骨と頭頂間骨の一部を電気エンジンを用いて切削・除去した。硬膜とクモ膜を除去し、小脳及び脳幹(延髄)の背側部を露出させた。微小刺激電極及び薬物微量注入に用いるカニューレは、マイクロマニピュレーターにより孤束核に位置されたガイドカニューレに挿入した。実験終了後、ラットは10%ホルマリン固定液にて灌流固定した。摘出した脳幹は30%ショ糖液に浸漬した後、厚さ50 µmの連続凍結切片を作製した。得られた切片はチオニン染色を行って、光学顕微鏡により注入部位の確認に用いた。

### (5) 使用薬物

迷走神経刺激による咀嚼筋の血流増加の末梢性神経機構を明らかにするために、この血流増加に対する諸種の自律神経遮断薬(自律神経節遮断薬-ヘキサメソニウム、ムスカリン受容体遮断薬-アトロピン、アドレナリンβ受容体遮断薬-プロプラノロール、アドレナリンα受容体遮断薬-フェントラミン)の静脈内投与の影響について検討した。また、この血流増加の中枢性神経機構を明らかにするために、孤束核への薬物の微量注入(グルタミン酸-興奮性神経伝達物質とムシモール-GABA<sub>A</sub>受容体のアゴニスト)が咀嚼筋の血流動態に与える影響について検討した。

## 4. 研究成果

### (1) 頸部迷走神経の電気刺激が咀嚼筋の血流動態と体幹血圧に与える影響

頸部迷走神経の求心性刺激は刺激強度(1-30 V, 図2B-b1)と刺激頻度(1-30 Hz, 図2B-b2)に依存した咬筋の血流増加を誘発し、この血流増加は20 V及び20 Hzで最大値に達した(図2A & B)。迷走神経刺激で生じる血流増加は体幹血圧の変化に非依存的に生じることから、咬筋における血管拡張反応によって生じていることが示唆される(図2-A)。

また、腹部迷走神経の求心性刺激は咬筋の血流に影響を与えなかったことから (図 2-A)、迷走神経の内臓求心性入力を介する咬筋の血管拡張反応には腹部 (胃消化器系) よりも胸部 (循環器や呼吸器系) からの入力が必要であることが示唆される。

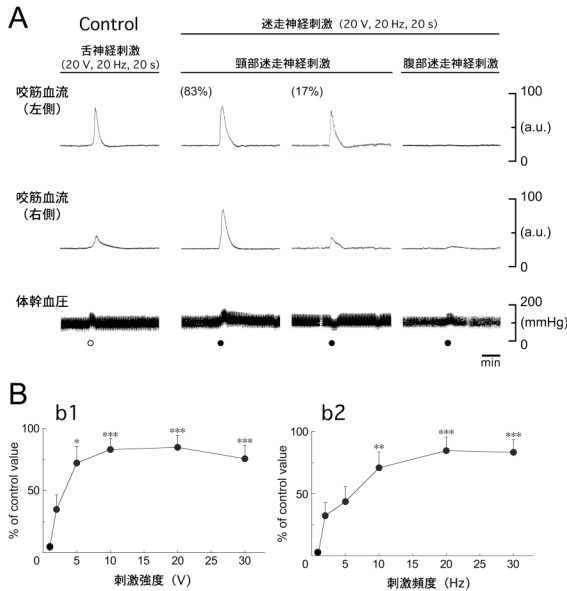


図 2. 三叉神経及び迷走神経の求心性入力が咬筋の血流と体幹血圧に与える影響

(A) 三叉神経 (○) 並びに頸部及び腹部迷走神経 (左側) の中枢性の電気刺激 (●) で生じる咬筋の血流変化と体幹血圧の変化. 頸部迷走神経刺激で生じる咬筋の血流と体幹血圧に認められる変化の出現頻度は、記録左上部の括弧内に示されている. (B) 頸部迷走神経の刺激強度 (b1, 1-30 V) 及び刺激頻度 (b2, 1-30 Hz) と咬筋の血流量 (同側, ●) との関係. 舌神経の求心性刺激で生じる咬筋の血流増加量をコントロールとした (control). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs. 基準値 (1 Hz 及び 1 V の頸部迷走神経の求心性刺激に対する咬筋の血流量).

(2) 頸部迷走神経刺激で生じる咀嚼筋の血流増加に関わる末梢性神経機構

迷走神経刺激で生じる咬筋の血流増加はヘキサメソニウム (図 8A-a1) 及びアトロピン (図 8A-a2) の静脈内投与で可逆的に有意に抑制されたが、プロプラノロール (図 8A-a3) 及びフェントラミン (図 8A-a4) の投与では影響を受けなかった (図 8B). これらの結果は、頸部迷走神経の求心性刺激で生じる咬筋の血流増加は、咬筋の血管を支配する副交感神経性血管拡張線維の活性化によって生じていることを示唆している。

(3) 頸部迷走神経刺激で生じる咀嚼筋の血流増加に関わる中枢性神経機構

孤束核 (門から吻側 1.0 mm, 正中から外側 1.0 mm) の微小電気刺激 (100  $\mu$ A, 10 Hz, 20 s) は咬筋に顕著な血流増加を誘発した (図 4A). 孤束核に対するグルタミン酸の微量注入 (50 nl/site) は濃度依存性 (1-100  $\mu$ M) に咬筋の血流増加を誘発した (図 4A & B). また、頸部迷走神経刺激で生じる咬筋の血流増加は孤束核に対するムシモール (1 mM) の微量注入 (50 nl/site) で顕著に抑制された (図 4B & D). これらの結果は、迷走神経刺激で生じる反射性血管拡張反応による咬筋の血流増加には、グルタミン酸による孤束核の介在ニューロンの活性化が関与するとともに、これらのニューロンに対する GABA 入力はこの血流増加の中枢抑制のメカニズムとして重要であることを示唆している。

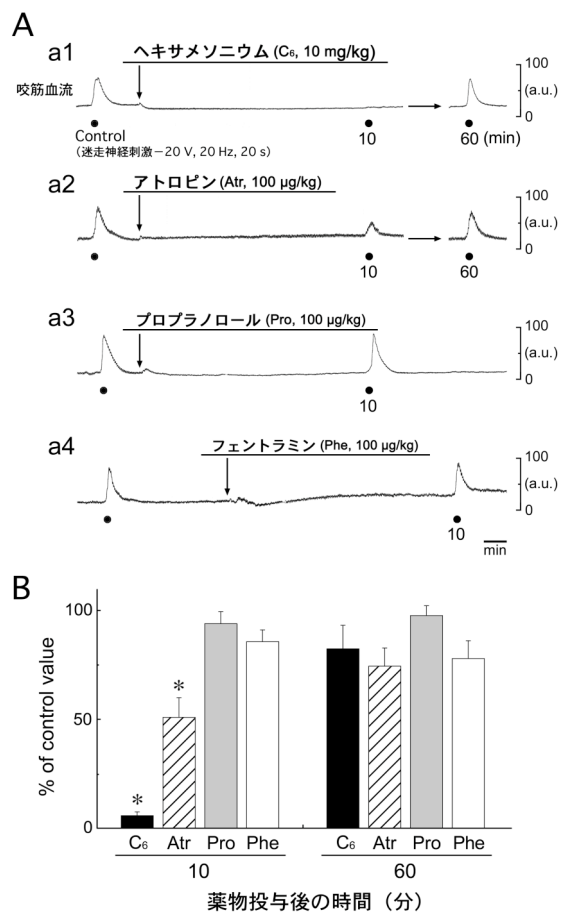


図 3. 自律神経遮断薬が頸部迷走神経の求心性刺激で生じる咬筋の血流増加に与える影響

(A) ヘキサメソニウム (Ce, a1)、アトロピン (Atr, a2)、プロプラノロール (Pro, a3) 及びフェントラミン (Phe, a4) の静脈内投与が頸部迷走神経の求心性刺激 (●) で生じる咬筋の血流増加 (同側) に与える影響. (B) 各遮断薬の投与後に迷走神経刺激で生じる咬筋の血流増加量の経時的変化 (10 & 60 min). 各遮断薬の投与前に迷走神経刺激で生じる

咬筋の血流増加量をコントロールとした (control). \* $p < 0.001$  vs. control.

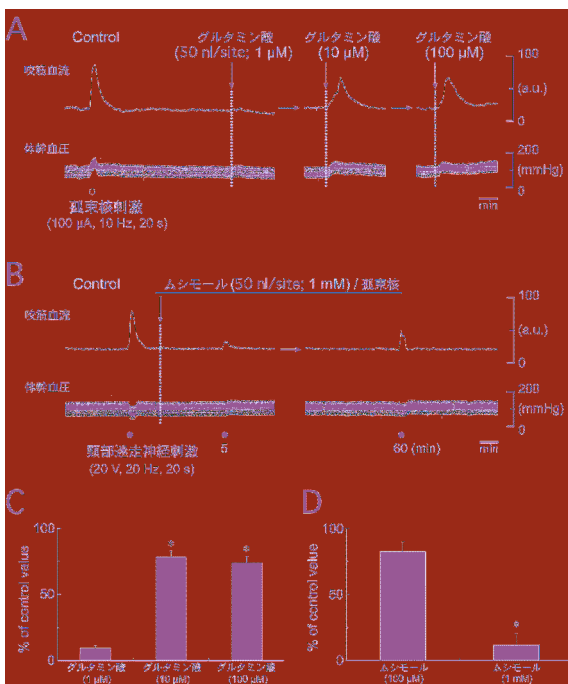


図 4. 孤束核の微小電気刺激と薬物の微量注入が咬筋の血流動態に与える影響

(A) 孤束核の微小電気刺激 (○) で生じる咬筋の血流増加とグルタミン酸 (1-100  $\mu\text{M}$ ) の微量注入 (50 nl/site) で生じる咬筋の血流変化. (B) ムシモール (1 mM) の微量注入 (50 nl/site) が頸部迷走神経の求心性刺激 (●) で生じる咬筋の血流増加に与える影響. (C) グルタミン酸の注入濃度と咬筋の血流増加量との関係. 孤束核の微小電気刺激で生じる咬筋の血流増加量をコントロールとした (control). \* $p < 0.001$  vs. 1  $\mu\text{M}$ . (D) ムシモールの注入濃度 (100  $\mu\text{M}$  & 1 mM) と迷走神経刺激で生じる咬筋の血流増加量との関係. ムシモールの投与前に迷走神経刺激で生じる咬筋の血流増加量をコントロールとした (control). \* $p < 0.001$  vs. control.

#### (4) 今後の展望

本研究により得られた一連の研究結果は、頸部迷走神経の求心性刺激は咀嚼筋の反射性血管拡張反応を介した血流増加に有効であり、全身の循環動態に与える影響も少ない優れた咀嚼筋の血流改善法に応用できる可能性を示唆している。

頸部迷走神経の求心路の大部分は胸部や腹部に由来する内臓求心性線維によって構成されていることが知られている (Paintal, *Physiol Rev* 53: 159-227, 1973; Berthoud & Neuhuber, *Auton Neurosci* 85: 1-17, 2000)。しかしながら、腹部迷走神経 (胃消化器系を支配) の求心性刺激は咀嚼筋の血流動態に影

響を与えないことから、頸部迷走神経に含まれる心臓や肺に由来する内臓求心性線維が咀嚼筋の反射性血管拡張反応に重要であることが推測される。また、循環器系からの求心性入力投射される孤束核の2次中継ニューロンにおいて、唾液核の副交感神経節前ニューロンに直接シナプスする介在ニューロンの存在が組織化学的に証明されている (Agassandian et al., *J Comp Neurol* 452, 242-254, 2002)。したがって、咀嚼筋の副交感神経性血管拡張線維を介する反射性の血流増加作用は全身の循環動態と密接に関連していることが示唆される。

孤束核の GABA 入力系は全身の循環動態の変調に関係することが示唆されているが (Mei et al., *Am J Physiol* 285: R1276-R1286, 2003)、孤束核の GABA 入力系と顎・顔面・頭部領域の自律神経性血流調節との関連性については明らかにされていない。しかしながら、三叉神経領域への侵害刺激は嚥下反射を司る脳幹の孤束核のニューロン活動を GABA 入力系を介して抑制することが近年報告されており (Tsujiura et al., *J Physiol* 587: 805-817, 2009)、これら侵害刺激による GABA 入力系の変調は顎・顔面・頭部領域の反射機能障害の誘因の一つとして重要であると考えられる。

今後は、1) どのような種類の内臓求心性入力に副交感神経性血管拡張反応に関わるのか、2) それらの入力で生じる咀嚼筋の血流増加の役割及び 3) 咀嚼筋の血流増加に対する GABA 入力を介する中枢抑制機構の詳細なメカニズムを明確にすることで、咀嚼筋における反射性血管拡張反応の生理学的な役割とそれらの血流障害及びそれに伴う機能障害との関連性についても明らかにしていきたいと考えている。

#### 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 7 件)

- ① Ishii H and Izumi H. GABA<sub>B</sub> receptors in the NTS mediate the inhibitory effect of trigeminal nociceptive inputs on parasympathetic reflex vasodilation in the rat masseter muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 302: R776-R784, 2012. DOI: 10.1152/ajpregu.00569.2011. 査読有り
- ② Izumi H, Ishii H and Mizuta K. Anterior hypothalamic inhibition of reflex parasympathetic vasodilatation in the lower lip and palate of anesthetized cats. *Dent J Health Sci Univ Hokkaido* 30:

43-52, 2011. <http://www.hoku-iryo-u.ac.jp/~dental-society/> 査読有り

- ③新岡丈治、石井久淑、和泉博之。レーザースペックル血流計による血流動態のイメージング解析。北医療大歯誌(総説) 30: 9-21, 2011. <http://www.hoku-iryo-u.ac.jp/~dental-society/> 査読有り
- ④ Ishii H, Niioka T and Izumi H. Parasympathetic reflex vasodilatation in the masseter muscle compensates for carotid hypoperfusion during the vagus-mediated depressor response. *Brain Res* 1370: 145-153, 2011. DOI: 10.1016/j.brainres.2010.11.046. 査読有り
- ⑤石井久淑、和泉博之。咀嚼筋の自律神経性血流調節に関する末梢性及び中枢性神経機構。自律神経(総説) 47: 340-349, 2010. <http://www.jsnr-net.jp/>
- ⑥ Ishii H and Izumi H. Vasodilator responses mediated by autonomic nervous system in the jaw muscles. *Dent J Health Sci Univ Hokkaido (Review)* 29: 1-23, 2010. <http://www.hoku-iryo-u.ac.jp/~dental-society/29-1.pdf> 査読有り
- ⑦ Ishii H, Niioka T and Izumi H. Vagal visceral inputs to the nucleus of the solitary tract: involvement in a parasympathetic reflex vasodilator pathway in the rat masseter muscle. *Brain Res* 1312: 41-53, 2010. DOI: 10.1016/j.brainres.2009.11.073. 査読有り

[学会発表] (計 7 件)

- ① Ishii H and Izumi H. GABA<sub>B</sub> receptors in the NTS mediate the inhibitory effect of trigeminal nociceptive inputs on parasympathetic reflex vasodilation in the rat masseter muscle. The Proceedings of the 89th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan (Nagano, Matsumoto Bunka Kaikan). *J Physiol Sci* 62 (Suppl): S135P, March 29, 2012.
- ②石井久淑、和泉博之。三叉神経領域の侵害入力による咀嚼筋の副交感神経性血管拡張反応の抑制作用。第53回歯科基礎医学会学術大会(岐阜、長良川国際会議場), *J Oral Biosci* 53 (Suppl): 175P, 2011年10月1日。

③Niioka T, Ishii H and Izumi H. Imaging analysis of parasympathetic vasodilatation in vasa nervorum of facial nerve with laser speckle imaging flowmeter. The Proceedings of the 88th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan and the 116th Annual Meeting of the Japanese Association of Anatomists (Kanagawa, PACIFICO YOKOHAMA). *J Physiol Sci* 61 (Suppl): S151P, March 28, 2011.

④ Izumi H, Ishii H and Niioka T. Parasympathetic masseter vasodilatation compensates for carotid hypoperfusion. 89th General session & Exhibition of the International Association for Dental Research (San Diego, USA, San Diego Convention Center). Program Book: 109P, March 17, 2011.

⑤石井久淑、新岡丈治、和泉博之。咀嚼筋の副交感神経性血管拡張反応は顔面・頭部領域の血流維持に関与する。第52回歯科基礎医学会学術大会(東京、タワーホール船堀), *J Oral Biosci* 52 (Suppl): 93P, 2010年9月21日。

⑥ Izumi H, Ishii H and Niioka T. Involvement of visceral inputs in vasodilatation in the masseter muscle. 88th General session & Exhibition of the International Association for Dental Research (Spain, Centre de Convencions Internacional Barcelona). Program Book: 187P, July 16, 2010.

⑦ Ishii H, Niioka T and Izumi H. Involvement of vagal visceral inputs to the nucleus of the solitary tract in parasympathetic reflex vasodilatation in the rat masseter muscle. The Proceedings of the 87th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan (Iwate, Morioka Civic Cultural Hall). *J Physiol Sci* 60 (Suppl): S147P, May 20, 2010.

[その他]

ホームページ等

<http://www.hoku-iryo-u.ac.jp/~physiol/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

石井 久淑 (ISHII HISAYOSHI)  
北海道医療大学・歯学部・講師  
研究者番号: 00275489