

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 21 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861718

研究課題名(和文) 大脳基底核における嚥下運動の調節機構の解明

研究課題名(英文) Research of the regulatory mechanism of swallowing movement in basal ganglia.

研究代表者

原田 丈司 (HARADA, TAKESHI)

大阪大学・歯学研究科(研究院)・研究員

研究者番号：00403030

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：Working heart brain stem preparation (WHBP) 標本を用いて嚥下運動におけるセロトニンならびにサブスタンス P の関与を明らかとした。また、嚥下運動における中枢神経機構を解明する有効な手法として、WHBP 標本における延髄孤束核への局所微量投与方法を確立させた。サブスタンス P が嚥下運動を促進的に制御し、さらに延髄孤束核の neurokinin-1 受容体を介した中枢神経機構が示唆された。さらにセロトニンは、延髄孤束核のセロトニン受容体を介して、嚥下運動を抑制的に制御することが示された。

研究成果の概要(英文)：It was revealed the involvement of substance P and serotonin in swallowing movement by using working heart brainstem preparation (WHBP). In addition, as an effective method to evaluate the central nervous mechanism in swallowing movement, it was establish micro injection method into the medulla oblongata nucleus of the solitary tract in WHBP. Substance P is promoted the swallowing movement, it was shown that the mechanism through the neurokinin-1 receptor in nucleus of the solitary tract. Furthermore, serotonin is inhibited the swallowing movement, it was suggested that the mechanism through serotonin receptor in nucleus of the solitary tract.

研究分野：神経生理学

キーワード：嚥下運動 WHBP 標本 サブスタンス P セロトニン ドーパミン

1. 研究開始当初の背景

嚥下運動は、口腔内に取り込まれた食物を、咽頭・食道を経て胃に送り込む反射性の運動であり、口腔・咽頭・喉頭・食道の多くの筋が決められた順序で協調して活動している。このステレオタイプであるが、再現性のある極めて精緻な嚥下運動は、延髄孤束核とその周辺の網様体に存在する Central Pattern Generator によって制御されているが、構成するニューロンの局在や性質、ニューロン間の結合様式について、いまだその全容は明らかにされていない。

嚥下運動に対する Central Pattern Generator の機序を検討した過去の報告では、相反する研究結果が示されており、実験動物の鎮静に要した全身麻酔薬や麻酔深度、あるいは投与薬剤による実験動物の循環ならびに呼吸の変動が、研究結果を副次的に修飾した可能性が指摘されている。WHBP (Working Heart Brainstem Preparation) 標本は、これらの全身麻酔薬が影響しない *in vivo* に近い状態の標本に対して、*in vitro* の研究手法を用いることができる有用な実験標本である。すなわち、酸素化された人工脳脊髄液を実験動物の脈管を通して組織内へ灌流するため、脳幹内におけるニューロンを広い範囲で機能的に維持することが可能である。さらに循環ならびに呼吸動態を体外循環に依存するため、実験動物の循環ならびに呼吸の変動に影響されない手法である。

申請者らは、ラットにおいて WHBP 標本を用いた嚥下運動モデルを作成し、上喉頭神経を電気刺激することで、自発的な呼吸活動を抑制し、一連の嚥下関連筋群の活動から成る嚥下運動を誘発させることができた。また WHBP 標本では、横隔神経の活動や嚥下関連筋群(顎舌骨筋、中咽頭収縮筋等)の活動を同時に記録することができ、嚥下運動における神経や筋肉の生理学的動態や

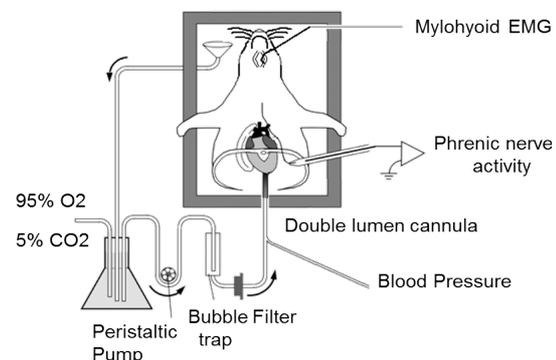
相互関係を検証できる。

超高齢化社会の中で、寝たきり者や脳血管障害の後遺症による嚥下障害は大きな問題となっているが、いまだに有効な治療法は確立されていない。本研究により、嚥下運動の神経・筋機構を検証することで、嚥下障害の病態をより深く理解でき、嚥下運動の中枢機構における新たな知見になると考えた。

2. 研究の目的

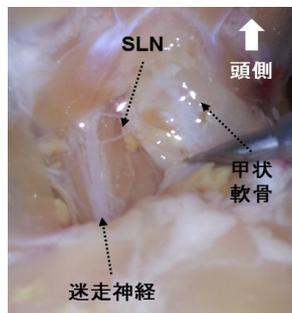
延髄縫線核群で生成されるセロトニンは、学習記憶、体温調節、情動や気分の調節、そして摂食行動を制御していることが知られているが、嚥下運動に対する中枢神経におけるセロトニンの調節機構は解明されていない。また、延髄の孤束核に広く分布する neurokinin-1 受容体に作用するサブスタンス P も嚥下運動を制御している神経ペプチドと考えられており、延髄の舌咽神経や迷走神経知覚枝におけるサブスタンス P の分泌により嚥下運動が調節されていることが報告されている。さらに大脳基底核において分泌されるドーパミンもサブスタンス P の分泌を修飾しており、嚥下運動におけるセロトニン、ドーパミンおよびサブスタンス P の関与を解明することで、嚥下運動の中枢機構における新たな知見になると考えた。

3. 研究の方法

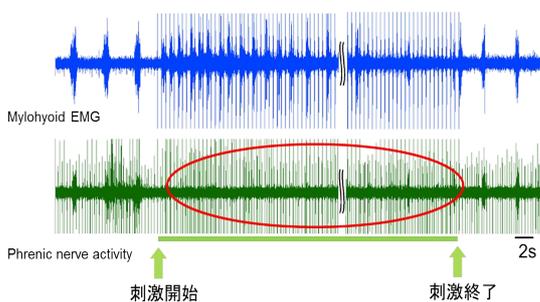


嚔下運動モデルである WHBP 標本は、5~6 週齡のラットを用いて作成する。ハロタン麻酔下において横隔膜下で下半身を切除し、4 に冷却した人工脳脊髄灌流液内で、頭蓋骨を除去し除脳を行った。下行大動脈にはダブルルーメンカテーテルを留置し、レコーディングチャンバー内で 95%O₂、5%CO₂ で飽和された人工脳脊髄液 (31) を、バブルトラップおよびのフィルター (40 μm) を通して、マイクロチューブポンプを用いて 20-30ml/分の速度で灌流した。また灌流圧測定器を接続して、バゾプレッシン (1.0-2.0nM) の投与や灌流速度を調節することで、灌流圧を 60-80mmHg に維持した。

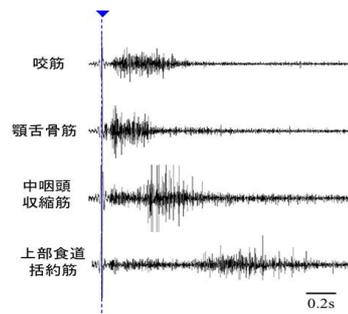
WHBP 標本の自発的な呼吸性運動を確認した上で、頸部腹側から片側の上喉頭神経を剖出し、電気刺激 強度: 5.0V、刺激時



間: 1ms) を、1.0Hz の頻度で与えて嚔下運動を誘発させ、連続嚔下の回数が 10 回に達するまで続けた。また、プラチナ製コーティングワイヤーを目的の筋束に留置して筋活動を記録し、先端径を 0.2-0.3mm に調節したグラスピペットをサクシオンエレクトロードに固定したグラス吸引電極に、剖出した横隔神経束を吸引留置して神経活動を記録した。上喉頭神経への電気刺激を開始した直後から、顎舌骨筋は刺激反応性の活動を亢進させ、横隔神経は神経活動を消失させた。また、咬筋、顎舌骨筋、中咽頭収



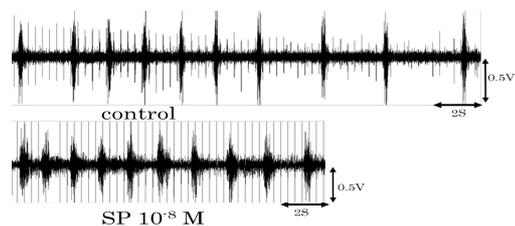
縮筋、上部食道括約筋の順序で連続する筋活動が確認でき、口腔内に注入した染色液を食道下部まで輸送できたため、嚔下運動と矛盾しない筋活動と考えた。



4. 研究成果

サブスタンス P が作用する neurokinin-1 受容体の嚔下運動における役割を検討するために、neurokinin-1 受容体作動薬である [Sar9, Met(02)11]-SP を WHBP 標本において全標本投与した。neurokinin-1 受容体作動薬の投与濃度 10⁻⁹M、10⁻⁸M、10⁻⁷M に対して、濃度依存的ではないが、平均嚔下回数 1.23 ± 0.17 が、それぞれ 1.70 ± 0.24 (10⁻⁹M)、1.78 ± 0.12 (10⁻⁸M)、1.74 ± 0.32 (10⁻⁷M) と有意に増加した。一方、neurokinin-1 受容体拮抗薬である CP-100263 の全標本投与では、平均嚔下回数は 1.17 ± 0.12 (10⁻⁸M) で、統計学的に有意な差は認められなかった。

次に、連続嚔下運動が 10 回誘発されるまでに要した時間を計測し、neurokinin-1 受容体作動薬ならびに拮抗薬の全標本投与における変化を計測した。

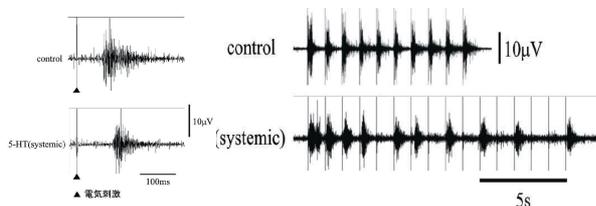


10 回連続嚔下時間の平均は 24.0 ± 8.2 秒で、neurokinin-1 受容体作動薬の投与濃度 10⁻⁹M、10⁻⁸M、10⁻⁷M に対して、それぞれ 10.2 ± 4.0 秒 (10⁻⁹M)、10.6 ± 3.6 秒 (10⁻⁸M)

11.9 ± 4.6 秒 (10⁻⁹M) と濃度依存的ではないが、統計学的に有意に短縮した。しかしながら、neurokinin-1 受容体拮抗薬の全標本投与における 10 回連続嘔下時間は 23.0 ± 10.4 秒 (10⁻⁸M) で、統計学的に有意な差は認められなかった。

また、セロトニンの嘔下運動における関与を検証するために、セロトニン受容体作動薬 (0.1 μM) を WHBP 標本において全標本投与し、嘔下運動の変化を検証した。その結果、10 回連続嘔下運動の発現頻度ならびに顎舌骨筋活動の最大振幅は統計学的に有意に減少し、電気刺激から嘔下運動開始までの嘔下潜時は有意に延長した。

以上の結果は、WHBP 標本において誘発さ

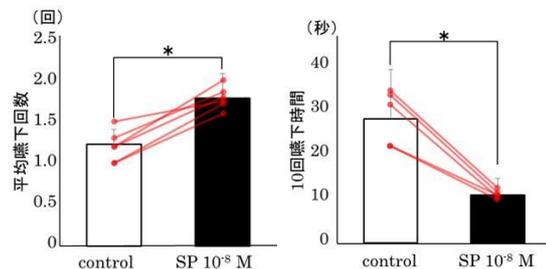


れた嘔下運動に対して、サブスタンス P が促進的に、セロトニンが抑制的に制御することを示唆する結果と考えられた。

サブスタンス P ならびにセロトニンの中枢神経における役割を検証するために、WHBP 標本における局所微量投与法を確立させた。延髄の背側よりマイクロマニピレーターで固定したマイクロインジェクションシリンジを嘔下運動の Central Pattern Generator が存在する延髄孤束核に挿入し局所微量投与を行った。挿入位置はレコーディングチャンバーに付属した頭位固定装置で計測し、Obex より側方に 0.5mm、吻側に 0.5mm、深さ 0.2mm とした。実験終了後に投与位置を確認するために、染色液 (ポンタミンスカイブルー2%) を薬剤と同時に投与し、4%ホルマリンで固定し、100 μm の凍結切片を作成して、顕微鏡で確認した。

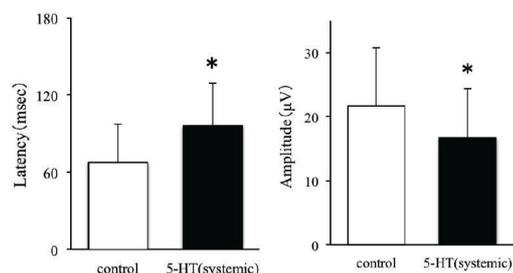


まず延髄孤束核に neurokinin-1 受容体作動薬を局所微量投与すると、平均嘔下回数は 1.24 ± 0.07 回に対して、1.65 ± 0.11 回と有意に頻度が増加したが、染色液のみを局所微量投与しても、嘔下活動頻度に変化は見られなかった。また 10 回連続嘔下時間は、27.4 ± 10.6 秒から 10.6 ± 3.6 秒と統計学的に有意に短縮した。そのため、延髄孤束核における neurokinin-1 受容体が、嘔下運動に対して促進的な制御機構に關与していることが示唆された。



次にセロトニン受容体作動薬 (1mM) を局所微量投与したところ、連続嘔下活動の発現頻度と顎舌骨筋最大振幅の低下が認められ、嘔下潜時の延長が認められた。

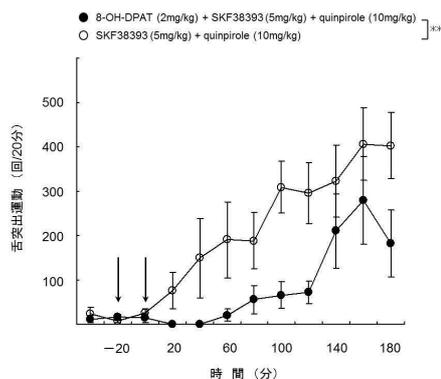
以上の結果は、嘔下活動を制御するセロトニン受容体が延髄孤束核に存在し、かつセロトニン受容体が嘔下運動に対して抑制的に制御していることが示唆された。



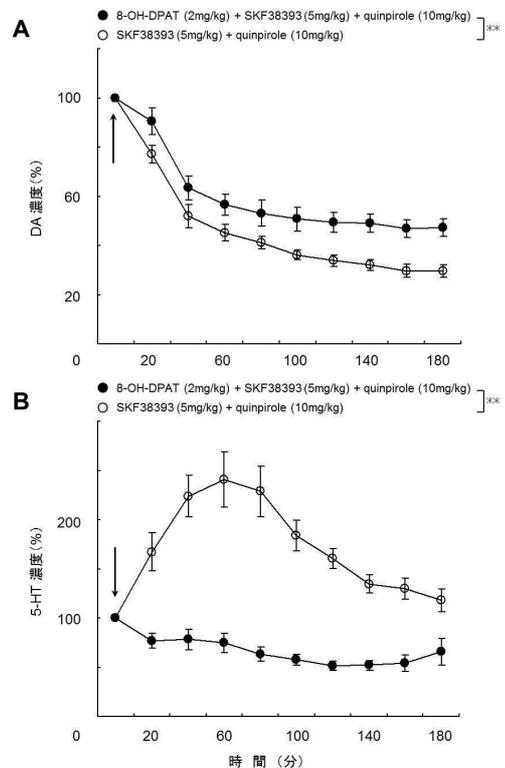
脳マイクロダイアリス法を用いて、摂食行動に対する大脳基底核のドーパミンならびにセロトニンの関与について検証し、WHBP 標本における知見との関連を考察した。脳マイクロダイアリス法は特定の脳

部位における神経伝達物質を自由行動下で real time に経時的にモニタリング可能な手法である。申請者らは、これまで脳マイクロダイアリス法を用いて、自由行動下でのラットの大脳基底核の黒質線条体におけるドーパミンならびにセロトニン濃度を測定し、ドーパミン受容体作動薬 SKF38393 (5mg/kg) と quinpirole (10mg/kg) の混合溶液を全身投与すると、舌運動が有意に増加し、黒質線条体におけるドーパミン分泌が減少し、逆にセロトニン分泌は増加することを報告した。そこで、摂食行動の一つである舌運動に対するセロトニンの効果を検証するために、セロトニン 1A 受容体作動薬 8-OH-DPAT (2mg/kg) を前投与し、ドーパミン作動薬の全身投与によって誘発される舌運動の変化を検証した。

セロトニン 1A 受容体作動薬を前投与すると、薬剤投与直後から投与後 1 時間までの 20 分当たりの舌運動は約 10 回 (/20 分) と有意に減少した。その後は徐々に増加し、ドーパミン受容体作動薬投与後と同様の増加傾向を示した。



また、側坐核におけるドーパミン濃度については、ドーパミン受容体作動薬投与直後より測定終了時まで漸減するが、セロトニン 1A 受容体作動薬を前投与することで、ドーパミン濃度の減少が有意に小さいことが示された。そして、側坐核におけるセロトニン濃度については、セロトニン 1A 受容体作動薬の前投与によりドーパミン受容体作動薬投与直後より漸減した。



脳マイクロダイアリス法を用いたこれらの結果は、セロトニン 1A 受容体の前投与によりセロトニン神経細胞体上の auto-receptor による negative feedback によってセロトニン神経を抑制させ、側坐核におけるセロトニンを減少させたことを示唆している。in vivo の自由行動下でも摂食行動としての舌運動の減少が認められたが、WHBP 標本においても嚙下運動の中樞神経におけるセロトニン 1A 受容体の関与を示す成果が得られ、延髄孤束核において嚙下運動に対するセロトニンの関与が示唆された。また、延髄孤束核およびその周辺におけるサブスタンス P が嚙下運動の発現閾値を中枢性に低下させ、促進的に調節することも示されたが、大脳基底核の黒質線条体、側坐核、延髄孤束核におけるセロトニンやドーパミン濃度の変化に対する、延髄孤束核のセロトニンやサブスタンス P の相互作用に関しては明らかにできなかった。そのため今後は、延髄孤束核におけるドーパミンやセロトニン、サブスタンス P の濃度変化を測定して相互作用の検証を行うとともに、どのようなサブタイプが嚙下運

動に深く関与しているかを探究することが
焦点となると考えられた。

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 0 件)

[学会発表](計 5 件)

1. 原田文司、山西整、密田正喜仁、山元
有理、平野吉子、西尾順太郎：粘膜下
口蓋裂の顎発育に関する検討 . 第 59 回
日本口腔外科学会総会・学術大会 . 2014
年 10 月 18 日・幕張メッセ / 千葉 .
2. 外川健史、青海哲也、山西整、原田文
司、小橋寛薫、近藤敬秀、古郷幹彦：
嚥下活動に対するセロトニンの効果 .
第 69 回日本口腔科学会学術集会 . 2014
年 5 月 13 日・大阪国際会議場 / 大阪 .
3. 原田文司、山西整、密田正喜仁、平野
吉子、山元有理、峪道代、井上直子、
西尾順太郎：Furlow 法による軟口蓋形
成術後の軟口蓋形態の経年的変化 . 第
39 回日本口蓋裂学会総会・学術集会 .
2014 年 5 月 21 日・砂防会館 / 東京 .
4. 外川健史、青海哲也、山西整、原田文
司、小橋寛薫、近藤敬秀、古郷幹彦：
嚥下活動に対するセロトニンの効果 .
第 60 回日本口腔外科学会総会・学術大
会 . 2015 年 10 月 16 日 . 名古屋国際会
議場 / 愛知 .
5. 近藤敬秀、山西整、青海哲也、原田文
司、外川健史、小橋寛薫、関壮樹、古
郷幹彦：新生仔ラット延髄スライス標
本を用いた嚥下活動の解析 . 第 60 回日
本口腔外科学会総会・学術大会 . 2015
年 10 月 17 日 . 名古屋国際会議場 / 愛
知 .

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原田 文司 (HARADA TAKESHI)

大阪大学・歯学研究科 (研究院)

招聘教員

研究者番号 : 00403030