

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 酒井 翔悟
学位 博士 (歯学)
学位記番号 新大院博 (歯) 第351号
学位授与の日付 平成28年3月23日
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当
博士論文名 Modulation of excitability of trigeminal neurons during electrical stimulation of the superior laryngeal nerve in anesthetized rabbits
(麻酔下ウサギにおける上喉頭神経刺激時三叉神経ニューロンの興奮性変調)

論文審査委員 主査 瀬尾 憲司 教授
副査 山村 健介 教授
副査 井上 誠 教授

博士論文の要旨

1. 目的

咀嚼や嚥下といった摂食行動に欠かせない運動はほぼすべての哺乳類に認められる。我々は、日常的には意識することなく食物を捕食し、咀嚼し、これを嚥下する。このことは、咀嚼や嚥下運動を制御する基本的な神経機構は脳皮質以下の神経ネットワークに備わっていることを示唆する。

口腔内への刺激によって誘発される開口反射には、非侵害性 (低閾値) と侵害性 (高閾値) の刺激によって誘発されるものがある。このうち、低閾値刺激誘発性の開口反射は咀嚼中に強い抑制を受け、さらにその抑制は、咀嚼のパターン発生器と呼ばれる細胞集団 (Central pattern generator, CPG) からの入力を、開口反射路を形成する三叉神経核ニューロンが受けることにより生じるとされる。一方、同様の開口反射は、上喉頭神経 (Superior laryngeal nerve, SLN) を刺激して誘発された嚥下時にも抑制を受ける。そこで、嚥下時の開口反射の抑制メカニズムが、咀嚼時同様下位脳幹に存在する嚥下の CPG の活性化によって生じる可能性があるとの仮説を立てた。本研究の目的は、上喉頭神経を電気刺激して誘発された嚥下時における開口反射や三叉神経ニューロンの変調メカニズムを検証することである。

2. 方法

実験にはウレタン麻酔下の雌性ウサギ (2.5-3.0 kg, 日本白色種) を使用した。嚥下誘発のために SLN に連続電気刺激 (30 Hz, パルス時間 0.2 ミリ秒) を行った。SLN への刺激は 10 秒間で 1 度嚥下が生じる強度を 1T として、2, 4, 8T の刺激強度を用いた。開口反射の誘発を確認するために顎二腹筋、嚥下反射記録のために顎舌骨筋活動を記録した。口腔内への刺激として下歯槽神経 (Inferior alveolar nerve, IAN) の電気刺激 (単発, パルス時間 0.2 ミリ秒) を行い、これに応答する三叉神経核の単一ニューロンを同定後、IAN 単独刺激 10 秒間 (2 Hz)、IAN と SLN の同時刺激 10 秒間、再度 IAN の単独刺激 10 秒間を行い、SLN 刺激前・中・後でのニューロン活動を比較した。さらに、記録部位への直接刺激 (単発, パルス時間 0.2 ミリ秒) を行った際の顎二腹筋筋活動誘発の有無を確認した。記録および刺激部位は記録終了後に電気凝固し、脳幹を摘出後 10%ホルマリンにて固定した後、凍結切片を作製して組織学的に確認した。

3. 結果

SLN 刺激によって嚥下反射が誘発され、誘発される嚥下回数は刺激強度に依存して増加した。IAN 刺激に応答する計 27 個の単一ニューロンが同定され、その部位は三叉神経主感覚核、脊髄脊髄側側核、中脳路核、三叉神経間域などであった。

同定されたニューロンでは、SLN 2T, 4T, 8T 刺激中および刺激後にその活動が消失するものが観察された (27 個中 15 個, 55.6%)。ニューロン活動が消失する割合は、SLN 刺激後のみ、その強さに依存した。一方、記録されたほ

ほとんどのニューロンは、SLN 刺激中には IAN 刺激に比して潜時が延長した (27 個中 26 個, 96.3%)。潜時を 3.0 ミリ秒未満 (短潜時) と 3.0 ミリ秒以上 (長潜時) に分けて SLN 刺激時における両群の潜時の延長を比較したところ、いずれの条件 (SLN 刺激強度, SLN 刺激中もしくは刺激後) においても、長潜時を有するニューロン群が有意に長かった。顎二腹筋への投射が認められたニューロンは 27 個中 18 個 (66.7%) であり、その平均潜時は 2.6 ミリ秒であった。変調を認めたニューロンに部位依存性は認められなかった。

4. 考察

IAN 刺激に応答する三叉神経単一ニューロン活動は SLN 刺激を終了した後も抑制を受けていたことから、嚥下運動の直接的な影響だけでなく、嚥下の CPG のニューロン活動が変調に寄与している可能性がある。嚥下 CPG が活性化し嚥下運動が誘発されると、頬粘膜や舌による食物の咽頭への輸送が行われるが、円滑な嚥下運動が遂行されるために、口腔内の低閾値な感覚入力も遮断される割合が高くなることが示唆された。

今回記録したニューロンにおいて、3.0 ミリ秒以上の長潜時ニューロンは 3.0 ミリ秒未満の短潜時ニューロンよりもより強く変調を受けていた。変調を来たす入力も、三叉神経 1 次求心性神経終末部や 2 次ニューロンだけでなく、多シナプス性の介在ニューロンにも起きている可能性が示された。

三叉神経核ニューロン活動の SLN 刺激による変調メカニズムとして、嚥下 CPG の活性化による脳幹レベルでの制御以外に、嚥下運動が生じたことによる感覚フィードバックの影響、上位脳からの下行性入力による影響が可能性として考えられる。本実験の結果、SLN 刺激後には刺激強度に依存したニューロン活動の変調に差が認められたが、刺激時には差がなかった。嚥下運動に伴う感覚フィードバックが影響している可能性、SLN 刺激に伴う上位脳の影響などを含めて、いずれの中枢が口腔感覚の変調をもたらすかについての解明は今後の検討課題である。

審査結果の要旨

本研究は口腔感覚の伝達にかかわるニューロン活動が上喉頭神経の求心性活動によって抑制されることを、上喉頭神経への電気刺激により開口反射に関わるニューロン活動が抑制することを検討した。開口反射は嚥下をさせる刺激によって抑制されることが既に報告されている。また下歯槽神経から三叉神経核に伝達されて、いくつかの介在ニューロンを介して運動覚に伝達される経路をとる。一方、上喉頭神経は孤束核を経由し、この反射の伝達経路に抑制を与えることが知られているため、本研究では上喉頭神経刺激の強度の違いによる抑制効果への影響と、その抑制効果の出現と刺激とのタイミングについて検討した。これにより上喉頭神経からの感覚入力に口腔感覚へ影響することを考察した。

方法：実験動物としてウサギを使用したのはマウスやラットなどの小動物では求心性神経の伝達距離が短くなるために、伝達距離を稼ぐためにも大きな動物を使用した。すなわち開口反射を引き起こす三叉神経ニューロン活動の反応潜時の変化を検出しやすくした。上喉頭神経刺激による単発刺激が三叉神経核への単発のニューロン興奮を引き起こし、それが開口反射を抑制させることとして、開口反射に認められる三叉神経核の神経活動の反応潜時への影響と開口反射抑制の有無について検討した。

結果：上喉頭神経への刺激が強くなるほど嚥下活動が強く誘発され、嚥下を引き起こすまでの反応潜時は短くなった。下歯槽神経の電気刺激により開口反射を誘発する三叉神経核内のニューロンの中で、上喉頭神経刺激によって抑制を受けるニューロンと受けないニューロンとの位置的な分布には一定の傾向は認めず、これらは主知覚核、脊髄脊髄側核、中脳脊髄核領域に分布していた。一方、上喉頭神経への刺激強度が大きくなると誘発されるニューロン活動の抑制効果は大きくなり、またこれ刺激が終わったあとに強くなる傾向があった。反応潜時への影響では、3ms以上の長い反応潜時を有する反応の方が短い方よりも強く抑制される傾向があった。

結論：以上の結果は、上喉頭神経刺激が口腔感覚からの神経活動に影響することを示し、これは喉頭付近の感覚が、口腔感覚を抑制することを示唆している。

① 上喉頭神経電気刺激とは具体的にどのような生理学的状態を指しているか？

(解答) 上喉頭神経には低閾値器機的受容体の求心性神経のみならず自律神経(副交感神経)を含む。刺激に伴い血圧や呼吸数の変化が認められることもあることから、これらの神経に刺激が及んでいる可能性は否定できないものの、基本的には喉頭の触覚刺激に関連すると考えている。

② 開口反射を誘発する神経回路におけるニューロンの抑制とはどういう機序であると考えられるか？

(解答) 今回記録したニューロンでは2Hzの単発刺激に対する応答を記録しているため、高頻度刺激によって生じると考えられるシナプス伝達物質の枯渇、また不応期の影響によってニューロンの応答が消失している可能性は低い。今回記録したニューロンにおける抑制効果としては、活性化した嚥下CPGからの持続的なシナプス前・後における抑制の影響が生じている可能性が高いと考えている。しかし、今回行った記録は細胞外記録であり、さらに詳細なメカニズムの検証を行うためには細胞内記録にて膜電位変化を検証するなどの実験が必要である。

③ 下歯槽神経刺激による誘発されたニューロンの反応潜時を3ms以上とそれ以下に分けて反応潜時の延長効果を調べているが、3msを境界に区分した意味は何か？

(解答) 過去の論文を参考とすると、3msは短シナプスを反映した伝達を、それ以上のものは多シナプスを介した伝達系であり、その結果、長潜時ニューロンが有意に延長した結果から、三叉神経核のニューロンに広い範囲で抑制性の入力が存在する可能性が示唆された。

④ ニューロンの潜時について modulated neuron と判断した統計解析方法を説明せよ。

(解答) 今回の実験のプロトコールにおいては下歯槽神経を2Hzにて30秒間刺激し、途中10秒間上喉頭神経を刺激することで最初の10秒間をControl、途中10秒間をStim、最後の10秒間をPost-stimのように分割した。それぞれのperiodでは20回の下歯槽神経刺激を行い、20個のSingle unitが誘発されることとなります。潜時の延長は、Stim、Post-stimそれぞれのperiodの20個のニューロン潜時の平均を、Controlの20個のニューロン潜時の平均で減じることで算出し、その差を2群間の統計比較としてStudent t test またはMann Whitney U test を用いて解析した。その

結果に基づき Control と比較してニューロンの潜時が有意に延長したニューロンを Modulated neuron と定義した。

⑤ ニューロンの変調と組織学的分布に関連はみられたか。

(解答) 今回記録されたニューロンは三叉神経主感覚核、中間脳核、中間領域、脊髄脊髄核側面核に分布しており、誘発頻度の低下、潜時の延長のいずれかがみられた Modulated neuron の分布は部位依存的ではなかった。したがって変調を受けたニューロンに部位依存性がみられなかったことから、開口反射だけでなく、口腔感覚情報の伝達に関与するニューロンに広く抑制性の入力が存在する可能性が考えられた。三叉神経脊髄核は尾側に移行する程痛み感覚受容に関与するニューロンが多く分布しており、今回記録したニューロンはほとんどが低閾値誘発性、つまり機械感覚受容ニューロンであると考えられた。組織学的に脊髄脊髄核側面核より尾側の領域に記録したニューロンが分布していなかったことは矛盾の無い結果であった。

⑥ 記録したニューロンの潜時の延長は何を意味しているか。

(解答) 今回記録したニューロンでは 2Hz の単発刺激に対する応答を記録しているため、高頻度刺激によって生じると考えられるシナプス伝達物質の枯渇、また不応期の影響によってニューロンの応答が消失している可能性は低い。記録を行う前に上喉頭神経の条件刺激を行わず、30秒間60回の刺激にてニューロンの応答がすべてみられることを確認しているため、その点からも上記の可能性は否定される。一方、記録したニューロンに対して抑制性の入力が存在する場合には、潜時の延長が生じると考えられる。Pre synaptic 抑制の場合は、二次ニューロンに対する求心性線維の終末での伝達物質の作用の遅延、Post synaptic 抑制の場合はニューロン細胞体の膜電位変化による活動電位発生の遅延が生じ、結果的にニューロンの発火の潜時が延長する。一方、抑制性の入力が生じた際、記録しているニューロンの応答が多シナプスを介した経路からの入力によるものに変化した可能性も考えられるが、シナプス間の伝達には 0.4-0.6ms の時間が必要となり、よりシナプスを介した入力に変化した場合、少なくとも 0.4ms の潜時の延長が観察されると予想された。今回記録したニューロンの潜時の延長はほとんどが 0.3ms 未満であることから、入力の経路が変化した可能性は低い。したがって、このニューロンにおける抑制効果は、活性化した嚥下 CPG からの持続的な抑制が生じている可能性が高いと考える。

⑦ ニューロンの抑制と開口反射抑制との関係について説明せよ。

(解答) 今回記録した 27 のニューロンのうち 18 は直接刺激によって顎二腹筋活動が応答した。また、ニューロンの潜時と顎二腹筋応答の潜時から開口反射経路上のニューロンである可能性が高いものも認められたため、記録したニューロンのいくつかは開口反射の抑制に関与していたと考えられた。従ってこれらが記録したニューロンが開口反射経路上のものであると仮定すると、ニューロンの誘発頻度の低下は直接的に開口反射の振幅の減少に寄与し、またニューロンの潜時が延長した場合でも、顎二腹筋上で開口反射として観察される複合活動電位の振幅は減少すると考えられる。

⑧ 結果的に上喉頭神経の刺激が開口反射を抑制するとしたが、この生理的な意味を述べよ。

(解答) 嚥下中に口腔感覚を抑制することは、食塊が嚥下により喉頭を通過するとき口腔を閉鎖するために口唇などからの反射を抑制し、閉口状態を維持するためではないかと考えた。

以上の研究の内容と試問の解答を審査した結果、本論文を博士課程の学位論文として認めた。



