



Title	ラット working heart-brainstem preparation を用いた嚥下運動の解析
Author(s)	青海, 哲也
Citation	大阪大学, 2013, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/55537
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

学位論文

ラット working heart-brainstem preparation
を用いた嚥下運動の解析

2013年2月

大阪大学大学院歯学研究科

顎口腔病因病態制御学講座

口腔外科学第一教室

青海哲也

学位論文

ラット working heart-brainstem preparation を用いた嚥下運動の解析

2013 年 2 月

大阪大学大学院歯学研究科
顎口腔病因病態制御学講座
口腔外科学第一教室
青海哲也

緒言

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、脳血管障害者や寝たきりの老人に多い誤嚥性肺炎は、嚥下障害が主な原因であり¹⁾、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。このような嚥下障害に対して、口腔ケアや嚥下リハビリテーションが行われているもの²⁾、これらは誤嚥性肺炎の予防であり、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、ステレオタイプではあるが再現性のある極めて精緻な活動であり³⁾、その活動パターンは延髄弧側核(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⁴⁾。これまでの研究によって、gamma aminobutyric acid (GABA)⁵⁾、グルタミン酸⁶⁾、ペプチドホルモンであるレプチン⁷⁾、さらに Brain - derived neurotrophic factor (BDNF)⁸⁾などが、NTS およびその周辺領域において嚥下 CPG を賦活化または抑制することによって嚥下活動の発現に関与することが示されている。しかしながら、口腔から食道まで物質を輸送するための筋活動シーケンスを形成する中枢

神経メカニズムについてはほとんど解明されていないのが現状である⁹⁾。中枢神経内において多くの筋活動から成る緻密な協調運動を形成するためには、興奮性神経ネットワークのみならず、抑制性神経ネットワークが非常に重要な役割を果たすと考えられている⁹⁾。例えば、嚥下口腔相後期では嚥下咽頭相を司る神経ネットワークに対して、また嚥下咽頭相では嚥下食道相を司る神経ネットワークに対して抑制性のシグナルが伝達されると仮説を立てることは、筋活動シーケンスを形成する中枢神経メカニズムを理解するうえで合理的である¹⁰⁾。しかしながら、このような抑制性神経ネットワークの詳細はほとんど知られていない¹⁰⁾。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 (WHBP) 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¹¹⁾。WHBP は、特に呼吸活動を生成制御する中枢神経メカニズムに関する研究に対して近年よく用いられている実験手法である。低 O_2 や高 CO_2 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¹²⁾、*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¹³⁾。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。

そこで本研究では、WHBP 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する

目的で実験を行い、次に中枢神経内の代表的な抑制性神経伝達レセプターであるグリシン受容体及び GABA_A 受容体に着目し、WHBP を用いて嚙下 CPG における抑制性神経ネットワークの役割を明らかにすることを目的として実験を行った。

研究方法

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-20-005-0)と動物の愛護及び管理に関する法律を順守して行った。

WHBP の作製

実験には、52匹の生後21–30日齢 Sprague-Dawley 系ラットを用いた。WHBP の作製は、Paton の方法¹¹⁾に準じて行った。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℃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20–28 ml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ッシン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。(図 1)

人工脳脊髄灌流液の組成は、125 NaCl、24 NaHCO₃、3 KCl、2.5 CaCl₂、1.25 MgSO₄、1.25 KH₂PO₄、10 glucose (mM) (WAKO)、1.25% Ficoll (Sigma-Aldrich) とした。

神経・筋活動の記録

銀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、先端径が 0.2-0.3mm に調節された人工脳灌流液で満たしたグラスピペット(外径 1.5mm×内径 1.12mm、インターメディカル)をサクシオンエレクトロード(Suction Electrode、A-M Systems)に固定したグラス吸引電極を用いて、剖出した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。

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、エレクトリカルスティミュレーター (Electronic Stimulator、Nihon Kohden) を用いて電気刺激を加えた。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。

薬剤投与実験

GABA_A 受容体拮抗薬であるピククリン (0.2 μ M) (Bicuculine; BIC、Sigma-Aldrich) あるいはグリシン受容体拮抗薬であるストリキニーネ (0.04 μ M) (Strychnine; STR、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。BIC は dimethylsulfoxide (DMSO、WAKO) に 8 μ M となるように、また STR は ethanol (WAKO) に 2 μ M となるように溶解したストックソリューションを、薬剤投与実験の際に人工脳脊髄灌流液に投与した。それぞれの薬剤投与後は少なくとも 10 分以上経過した後、自発的な呼吸活動のリズムと活動パターンが安定したことを確認し実験を開始した。

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、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の検討では、顎舌骨筋および中咽頭収縮筋の同時記録、または顎舌骨筋と上部食道筋の同時記録を行い、薬剤投与前後での、顎舌骨筋の活動時間(A)、刺激から中咽頭収縮筋活動開始までの時間(B)、中咽頭収縮筋の活動時間(C)、顎舌骨筋と中咽頭収縮筋の活動が重複する時間(D)、刺激から上部食道筋活動開始までの時間(E)、上部食道筋の活動時間(F)、顎舌骨筋活動終了から上部食道筋活動開始までの時間(G)の変化について検討を行った。

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の検討では、SLN に対する連続電気刺激によって連続性の嚥下活動を誘発した上で、連続嚥下の回数が 10 回に達するまでの時間を測定し、薬剤投与前後での変化を検討した。

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は口腔、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の検討には Student's t-test を用い、一定回数の連続嚥下に要する時間の変化の検討には Paired t-test を用いた。有意水準は 5%とした。

結果

図 1 に、本標本の顎舌骨筋から記録した顎舌骨筋筋電図、横隔神経活動、およびカニューレより持続測定した灌流圧を示す。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。この呼吸活動は、5 時間前後は安定して発現し、安静状態では呼吸活動以外の活動は記録されなかった。

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図 2 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。

この SLN 電気刺激に反応して現れた活動が嚥下活動であることを確認するため、以下の実験を行った。

1) SLN 刺激反応性活動発現中の呼吸活動の変化について

SLN 刺激反応性に発現する筋活動が呼吸活動を抑制するか否かを確認するため、SLN に対して連続電気刺激を加えた時の横隔神経活動の変化について検討した(n=4)。図 3 に結果を示す。SLN を連続電気刺激すると、顎舌骨筋には連続した刺激反応性の筋活動が認

められたのに対し、横隔神経では周期性呼吸活動の消失が認められた。

2) 口腔から食道への筋活動シーケンスの惹起について

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(n=4)。図 4A 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。この結果より、SLN 刺激により発現した筋活動は、顎舌骨筋から中咽頭収縮筋、上部食道筋へと連続した一連の筋活動を示すものと考えられた。

3) 口腔から食道への物質輸送について

SLN 刺激反応性活動が、口腔内から食道へ物質を輸送することを検討するため、染色液であるポンタミンスカイブルー5%(Chicago Sky Blue 6B, Sigma-Aldrich)0.1ml を標本の口腔内に注入し、呼吸活動のみで 10 分間放置した個体と、5 回の SLN 刺激反応性活動を惹起させた個体とで食道の染色範囲を比較した(n=4)。図 4B に結果を示す。食道の染色範囲は喉頭から横隔膜の高さを 100%としたときの喉頭から染色の最尾側端までの距離を%換算して比較した。SLN への電気刺激を行わず、自発性の呼吸活動のみの群では食道染色範囲は $22.5 \pm 13.1\%$ であったのに対し、SLN 刺激反応性活動を誘発した群では、全ての実験標本に

において食道の尾側切断端より染色液の漏出を認め、食道内は全域にわたり染色された (100±0%)。

以上の結果より、SLN 刺激反応性活動は呼吸活動を抑制し、口腔から食道への筋活動シークエンスを惹起するとともに、物質を口腔内から咽頭、食道へ輸送する活動であることが明らかとなり、本活動は嚥下活動であると考えられた。

2. 抑制性神経回路が嚥下活動のパターン形成に果たす役割についての検討

前述の実験により確立した、WHBP より安定して嚥下活動を誘発し得る実験条件を用い、中枢神経内の抑制性神経回路が嚥下活動のパターン形成に及ぼす影響を検討するために、GABA_Aレセプターの拮抗薬である BIC あるいはグリシンレセプター拮抗薬である STR 投与後の嚥下活動の変化について検討した。

1) 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タイミングの変化について

①BIC 投与による変化

図 5 には BIC 投与前後における顎舌骨筋と中咽頭収縮筋の筋電図の記録を示す (n=6)。本実験では、BIC 投与前後のすべての計測項目において、A (control: 0.45±0.03s, BIC: 0.43±0.04s, p=0.3)、B (control: 0.43±0.02s, BIC: 0.40±0.03s, p=0.2)、C (control: 0.42±0.02s, BIC: 0.37±0.03s, p=0.1)、D (control: 0.09±0.01s, BIC: 0.10±0.02s, p=0.3) と統計学的な有意差は認めなかった (図 6)。

図 7 には BIC 投与前後における顎舌骨筋と上部食道筋の筋電図の記録を示す (n=5)。

BIC 投与前後で E (control: $0.76 \pm 0.02s$, BIC: $0.71 \pm 0.03s$, $p=0.1$)、及び G (control: $0.19 \pm 0.03s$, BIC: $0.19 \pm 0.02s$, $p=0.4$) に統計学的有意差を認めなかったのに対し、F の上部食道筋活動時間は BIC 投与によって有意に延長した (control: $0.52 \pm 0.05s$, BIC: $0.68 \pm 0.04s$, $p < 0.05$) (図 8)。

②STR 投与による変化

図 9 には STR 投与前後における顎舌骨筋と中咽頭収縮筋の筋電図の記録を示す (n=8)。

STR 投与前後で A (control: $0.48s \pm 0.02s$, BIC: $0.50 \pm 0.03s$, $p=0.3$)、B (control: $0.45 \pm 0.02s$, BIC: $0.42 \pm 0.02s$, $p=0.1$)、C (control: $0.34 \pm 0.03s$, BIC: $0.37 \pm 0.04s$, $p=0.3$) に有意差を認めなかったのに対し、D の顎舌骨筋と中咽頭収縮筋の活動が重複する時間は STR 投与によって有意な延長を認めた (control: $0.09 \pm 0.01s$, STR: $0.14 \pm 0.02s$, $p < 0.05$) (図 10)。

図 11 には STR 投与前後における顎舌骨筋と上部食道筋の筋電図の記録を示す (n=8)。

STR 投与前後で E (control: $0.61 \pm 0.03s$, BIC: $0.57 \pm 0.04s$, $p=0.2$) 及び F (control: $0.53 \pm 0.08s$, BIC: $0.47 \pm 0.06s$, $p=0.2$) に有意差を認めなかったのに対し、G の顎舌骨筋活動終了から上部食道筋活動開始までの時間は STR 投与によって有意に短縮した (control: $0.12 \pm 0.03s$, STR: $0.03 \pm 0.04s$, $p < 0.05$) (図 12)。

以上の結果より、人工脳脊髄灌流液内への BIC 投与は、上部食道筋の活動時間を延長させるが、STR 投与は顎舌骨筋に対する中咽頭収縮筋、および上部食道筋の活動開始タイム

ングをいずれも短縮させることが明らかとなった。

2) 一定回数の連続嚥下に要する時間の変化について

①BIC 投与による変化

図 13A には BIC 投与前後の顎舌骨筋から記録した嚥下活動を示す。連続した電気刺激に対して発現した連続嚥下活動が、10 回に達するまでの時間を薬剤投与前後で計測したところ、BIC 投与によって全ての実験標本において(n=4)10 回嚥下に要する時間が短縮し、この変化には統計学的有意差を認めた(control: $23.75 \pm 2.17s$, BIC: $14.5 \pm 0.29s$, $p < 0.05$)。

②STR 投与による変化

図 13B に STR 投与前後で顎舌骨筋から記録した連続嚥下活動を示す。STR 投与によって、すべての実験標本で(n=4)10 回嚥下に要する時間が延長し、この変化には統計学的有意差を認めた(control: $25.00 \pm 1.73s$, STR: $34.50 \pm 3.28s$, $p < 0.05$)。

考察

本研究によって WHBP に対して SLN 電気刺激を行うことにより、安定した嚥下活動を誘発し得る実験条件が確立された。同時に、WHBP には嚥下活動を形成するための中枢神経ネットワークが機能的に保持されていることも明らかとなった。われわれの知る限り、WHBP に対して嚥下活動の誘発を試みた報告はこれまで無かった。さらに、今回の研究によってグリシン受容体及び GABA_A 受容体の拮抗薬を用いた薬剤投与実験により、グリシン受容体は顎舌骨筋に対する中咽頭収縮筋および上部食道筋の活動開始タイミングを形成し、GABA_A 受容体は食道筋の活動時間を制御していることが示唆された。また、繰り返し嚥下の誘発速度に対して GABA_A 受容体は抑制的に制御するのに対し、グリシン受容体が促進的に制御している可能性が示唆された。

WHBP について

WHBP は、1996 年に Paton によって低 O₂ や高 CO₂ といった体外環境の変化に対して *in vivo* 実験標本や *awake* 動物が示す呼吸パターンの変化を正確に再現できることが報告されて以来¹¹⁾、*in situ* 標本と呼ばれ、主に呼吸活動を生成、制御する中枢神経メカニズムの研究に現在も広く用いられている実験手法である。それまでの呼吸の中枢神経メカニズムの研究には、主に *in vitro* の新生仔ラット摘出脳幹脊髓標本が用いられていたが¹⁴⁾、この標本で記録される自発的呼吸活動は、低 O₂ や高 CO₂ 環境への暴露に対しても活動パターンの変化を

示さず、さらにこの定常的な活動パターンは *in vivo* 実験標本や *awake* 動物が低 O₂ 環境で発現する「あえぎ呼吸」と相似する¹⁵⁾。これは、この新生仔ラット摘出脳幹脊髄標本では、標本内のニューロンに対する酸素供給が標本の表面からの人工脳脊髄灌流液の浸透に依存していることから、深部の組織には十分な酸素供給が行われず、標本が慢性的な低 O₂ 環境となっているためであると考えられている¹⁶⁾。一方で、動物本来の脈管を利用して酸素化した人工脳脊髄灌流液を組織内へ灌流する WHBP では、ニューロンに対する酸素供給を十分に行うことができるため、新生仔ラット摘出脳幹脊髄標本よりも広範囲の神経ネットワークが機能的に温存される¹⁷⁾。このために WHBP では、体外環境の変化に対する呼吸活動の変化を *in vivo* 実験標本や *awake* 動物と同様に再現できるものと考えられている。さらに、WHBP では、呼吸のみならず血圧制御のための中枢神経ネットワークも機能的に温存されていることが確認されており¹⁸⁾、本標本では、脳幹内の神経ネットワークが非常に広い範囲で機能的に温存されていると考えられている。

上記の利点に加えて、WHBP では灌流液の循環にポンプを用いることから、*in vivo* 実験標本や *awake* 動物では得ることのできないアドバンテージを有する。そのアドバンテージの一つが薬剤投与実験の際の優位性である。すなわち、*in vivo* 実験標本や *awake* 動物では致死的なあるいは循環動態に影響する種類または濃度の薬剤を全身投与することは困難である。一方、WHBP では、動物の血液脳関門を通過する薬剤であれば、*in vitro* 実験環境とほぼ同様の薬剤投与が可能となる。さらに WHBP では、投与薬剤の濃度コントロールを正確に

行うことができる。本研究で用いた濃度の BIC を麻酔下ラットの脳脊髄液内に投与すると脳血管圧が著明に上昇する¹⁹⁾が、このような循環動態の変化は、得られた結果に対する解釈を困難にする。嚥下活動シーケンスを形成する神経ネットワークの解剖学的知見がほとんど蓄積されていないことから、嚥下 CPG の理解のために薬剤の全身投与は重要なアプローチとなる。そのため、これを行い得る WHBP は、今後、嚥下 CPG の解析を行うにあたり非常に大きなアドバンテージを有するものと考えられる。

WHBP において誘発された嚥下活動について

SLN への電気刺激は、嚥下活動を誘発する方法として、これまで麻酔下の動物から *in vitro* の脳幹標本に至るまで広く用いられてきた手法である²⁰⁾。SLN へ加えられた電気刺激は、知覚枝である上喉頭神経外枝から迷走神経を上行し、下神経節及び上神経節を介して延髄孤束核 *interstitial subdivision* に達する²¹⁾。*interstitial subdivision* を含めた孤束核内には一様にグルタミン酸受容体が発現しており²²⁾、さらに上下神経節内にはグルタミン酸作動性ニューロンが多数存在する²³⁾。加えて、孤束核 *interstitial subdivision* 周辺に興奮性アミノ酸を微量注入すると、安定した嚥下活動が誘発される²⁴⁾ことから、SLN を上行する電気刺激は、主に孤束核 *interstitial subdivision* に終枝した迷走神経軸索末端から興奮性アミノ酸を分泌せしめることにより嚥下活動を開始するものと考えられている²⁵⁾。本研究においても、WHBP に対する SLN 電気刺激によって顎舌骨筋から記録された活動は、上記と同様のプロ

セスによって誘発された嚥下活動であると考えられた。しかしながら、これまで WHBP 上にて嚥下活動を誘発させた報告を認めなかったため、本標本で誘発された SLN 刺激反応性の活動が嚥下活動か否かを検証する必要性があった。本研究の結果より、1. SLN 刺激反応性の活動誘発時には横隔神経から記録される自発性の呼吸活動が抑制されること、2. SLN 刺激によって口腔から食道への筋活動シーケンスを認めること、さらに 3. SLN 刺激反応性の活動によって口腔から食道への物質輸送を認めることが明らかとなった。以上の結果から、本研究の WHBP における SLN 刺激によって惹起された活動は、嚥下活動であると考えられた。

本研究では、嚥下活動を誘発する際に口腔内に液体を含めた物質(食塊)は入れていない。従って、本研究によって誘発された嚥下活動は口腔咽頭粘膜からの知覚フィードバックがないという点において通常食物嚥下とは異なる。さらに、標本は前四丘体より上位脳を除脳していることから、誘発された嚥下活動には随意運動である口腔相前期は含まれておらず、主に脳幹内の嚥下中枢でプログラミングされた反射性の不随意運動である口腔相後期から咽頭相および食道相の嚥下活動が反映されているものと考えられた。

薬剤投与による嚥下活動パターンの変化について

本研究によって、BIC の投与により嚥下活動における上部食道筋の活動時間が有意に延長することが明らかとなった。食道の求心性入力が投射すると同時に嚥下時食道運動のプレ

モーターニューロンが存在すると考えられている孤束核 *central subdivision* 内には GABA_A 受容体が発現する²⁶⁾。さらに、食道運動を司るモーターニューロンが存在する延髄腹側の疑核 *compact formation* 内にも GABA_A 受容体の発現を認める²⁷⁾。これらいずれの部位の GABA_A 受容体をブロックしても今回の研究と同様の変化が起こり得ると考えられる。従って、嚥下活動時の上部食道筋の活動時間はこれらのいずれかあるいは双方の部位における GABA_A 受容体によって定常的に抑制性制御を受けていると考えられた。

また今回の研究では、STR の投与が、嚥下活動における顎舌骨筋に対する咽頭収縮筋および上部食道筋の活動開始タイミングを有意に短縮させた。これは WHBP において誘発された嚥下活動の口腔相後期、咽頭相、および食道相の活動開始タイミングの形成に脳幹内のグリシン受容体が関与する可能性を示唆するものと考えられた。グリシン受容体は主に延髄、脊髄および小脳に発現し、歩行、呼吸活動等のパターン形成に関わることが知られている代表的な中枢神経内の抑制性神経伝達を担う受容体である²⁸⁾²⁹⁾にも関わらず、嚥下活動のパターン形成への関与を示唆した報告はこれまでほとんど無い。グリシン受容体は NTS において *central subdivision* を含む腹外側に多く発現する³⁰⁾。この発現部位は嚥下の咽頭相および食道相のパターン形成を司るプレモーターニューロンが存在すると考えられている *interstitial subdivision* や *intermedial subdivision* と重複しており¹⁰⁾、これらの知見は本研究の結果を支持するものと考えられる。また、嚥下活動のシーケンス形成にあたり、嚥下の各相間における抑制性の協調関係の存在が推察されていた¹⁰⁾。つまり、嚥下口腔相後期では咽頭相嚥下

の開始が抑制され、嚥下咽頭相では食道相嚥下の開始が抑制されると仮定すると、嚥下活動パターンの緻密な協調運動の一部が合理的に説明できる。しかしながら、これらの抑制性協調を担う神経ネットワークの詳細はほとんど解明されていなかった⁹⁾。本研究によって、これらの協調に脳幹内のグリシン受容体が関わる可能性が示されたことは、嚥下 CPG の理解に大きな知見をもたらしたものと考えられた。

連続嚥下活動の発現頻度について

本研究において、BIC の投与により、連続 SLN 刺激によって発現した連続嚥下活動の発現頻度が増加した。これは嚥下活動の発現が、脳幹内の GABA_A 受容体によって抑制的に制御されている可能性を示唆するものであると考えられた。GABA_A 受容体は NTS 内に広く発現することが知られている³⁰⁾。NTS へ BIC を微量注入すると嚥下活動が誘発され、GABA_A 受容体作動薬を注入すると SLN 刺激によって誘発された嚥下活動が抑制される³¹⁾。また、*in vitro* 延髄脊髄標本では、BIC 存在下で SLN 刺激により安定した嚥下活動を発現することができる³²⁾。さらに、除脳ネコにおいては、延髄網様体内の GABA 作動性ニューロンによって嚥下活動の発現が抑制されると報告されている^{33) 34)}。これらの知見から、安静状態における嚥下活動の発現は GABA_A 受容体によって抑制的に制御されることが考えられている。本研究の結果は、これらの過去の知見と一致するものであり、安静時に嚥下活動の発現を抑制してい

る GABA_A 受容体をブロックすることによって、連続嚔下活動の発現頻度が増加したものと考えられた。

本研究では、STR の投与によって連続嚔下活動の発生頻度が減少することが明らかとなった。この結果は、定常状態において連続嚔下活動の発生頻度がグリシン受容体によって興奮性に制御されていることを示唆するものである。グリシン受容体によって活動発現頻度が増大するメカニズムについては明らかではないものの、嚔下活動を抑制的に制御する GABA 作動性ニューロンの活動性を、グリシン作動性ニューロンが抑制的に制御している可能性が推察された。マウス脊髄後核の lamina II-III に位置する GABA 作動性ニューロンはグリシン受容体を発現し、その活動性がグリシン作動性ニューロンによって抑制的に制御されている³⁵⁾。NTS 内にも同様の神経ネットワークが存在し、嚔下活動発現の制御に関わっている可能性が考えられた。

使用薬剤の受容体特異性について

本研究では、嚔下活動形成のための中枢神経ネットワークにおけるグリシン受容体および GABA_A 受容体の役割を検討するために、それぞれの受容体拮抗薬である STR および BIC を用いた。BIC は特異性の高い GABA_A 受容体拮抗薬であるが、GABA_A 受容体以外に一部のカルシウム依存型カリウムチャンネル (Small-conductance calcium-activated potassium channels; SK channels) も同時にブロックする可能性が示されている³⁶⁾。SK チャンネルは、チ

チャンネルの開確率が細胞内のカルシウム濃度に依存する K^+ イオンチャンネルであり、活動電位後に出現する遅延型後過分極 (slow afterhyperpolarization; slow AHP) を形成する³⁷⁾。この slow AHP は、持続的あるいは継続的に興奮性入力を受けるニューロンの興奮性を制御する上で非常に重要な役割を果たす³⁸⁾。つまり、活動電位の形成により活性化された電位依存性カルシウムチャンネルからの Ca^{2+} の細胞内への流入により、細胞内 Ca^{2+} が上昇すると、SK チャンネルが活性化することによって過分極を生じ、細胞膜の興奮性を抑制する³⁷⁾。従って、この SK チャンネルをブロックすると、ニューロンがバースト活動等の連続発火を発現する際にその発火頻度が上昇するといったような興奮性変化が生じると考えられる。本研究において、WHBP に対する BIC の投与によって、上部食道筋の活動時間が延長すると共に連続嚥下の発現頻度が上昇した。いずれの場合も、投与した BIC が上部食道筋のモーターニューロンあるいは嚥下活動の開始を司るニューロン上の SK チャンネルをブロックしたと仮定すると、それぞれのニューロンの興奮性が増加するため、本研究の結果と一致する。つまり、本研究の結果は BIC が SK チャンネルをブロックすることによって得られたものと解釈できる可能性がある。しかしながら、卵母細胞上に発現させたクローン SK チャンネルを用いた研究によって、BIC の SK チャンネルに対する IC_{50} (half maximal inhibitory concentration) は約 $35\mu M$ であり、本研究で用いた濃度である $0.2\mu M$ では SK チャンネルはほとんどブロックされないことが報告されている³⁶⁾。加えて、GABA 作動性ニューロンが定常的に嚥下活動の開始を抑制すること、および上部食道筋のモーターニューロンが存在する疑核 compact formation に

GABA_A 受容体が存在する²⁷⁾ことから、本研究における BIC の効果は、主に脳幹内の GABA_A 受容体に対する拮抗作用を介したものであると考えられた。

STR は、グリシン受容体に対する特異的な阻害薬であると同時に一部のニコチン性アセチルコリン受容体をブロックすることが示されている³⁹⁾。海馬中のニューロンに発現し、レセプターを構成する 5 量体に $\alpha 7$ サブユニットを含む、 $\alpha 7$ -containing ニコチン性アセチルコリン受容体 ($\alpha 7$ -containing nicotinic acetylcholine receptor; $\alpha 7$ -containing nAChRs) は、STR によってイオン透過性が抑制される⁴⁰⁾。しかしながら、 $\alpha 7$ -containing nAChRs は延髄内において、延髄背側迷走神経運動核および延髄腹背側に高度に発現するものの、孤束核内においてはほとんど発現を認めない⁴¹⁾従って、嚥下活動において延髄内の $\alpha 7$ -containing nAChRs をブロックすると、迷走神経支配領域の筋の活動性が抑制されるものと考えられるが、本研究において STR の投与前後で中咽頭収縮筋および上部食道筋の活動時間に明らかな変化は認めなかった。よって、本研究における STR の効果は $\alpha 7$ -containing nAChRs の抑制を介したのではないと考えられた。また、Matsubayashi らは、海馬細胞に発現する $\alpha 7$ -containing nAChRs の STR に対する IC₅₀ は 1.2 μ M であると報告している⁴²⁾。一方、本研究で用いた STR 濃度は、WHBP を用いて延髄機能を解析した過去の報告に用いられている濃度範囲内の⁴³⁾ 0.04 μ M である。よって、本研究で使用した STR 濃度は、 $\alpha 7$ -containing nAChRs の抑制効果を得るには十分な濃度ではなかった可能性も考えられた。さらに、興奮性アミノ酸受容体である NMDA (N-methyl-D-aspartate) 受容体の共結合部位としてグリシン結合部位が存在するが、

この NMDA 受容体上のグリシン結合部位は STR 非感受性であるとされている⁴⁴⁾ため、本研究における STR 投与に関して、NMDA 受容体を介した作用が影響している可能性は極めて低いものと考えられた。

結語

本研究で、Working heart-brainstem preparation を用いて嚥下活動を解析し得る実験条件を確立した。WHBP を用いた薬剤投与実験によって、嚥下活動の口腔相後期から咽頭相、さらに咽頭相から食道相への移行のタイミング形成にグリシン受容体が関与している可能性が示唆された。一方で、GABA_A 受容体は上部食道筋の活動時間を制御している可能性が示唆された。連続嚥下活動の発現頻度については、定常状態で GABA_A 受容体は抑制的に制御するのに対し、グリシン受容体が促進的に制御している可能性が示唆された。

謝辞

稿を終えるにあたり、本研究を行う機会を与えて頂き、終始御懇切なる御指導、御鞭撻を賜りました大阪大学大学院歯学研究科顎口腔病因病態制御学講座(口腔外科学第一教室)古郷幹彦教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究の立案ならびに進行にあたり、終始御教示、御指導いただきました大阪大学大学院歯学研究科顎口腔病因病態制御学講座(口腔外科学第一教室)山西整先生、原田丈司先生に深甚なる謝意を表します。最後に本研究の円滑な進展のため、特別な御配慮、御協力をいただきました大阪大学大学院歯学研究科顎口腔病因病態制御学講座(口腔外科学第一教室)の教室員諸兄に深甚なる謝意を表します。

参考文献

- 1) Vergis E.N., Brennen C., Wagener M., Muder R.R.(2001):Pneumonia in long-term care: a prospective case-control study of risk factors and impact on survival. *Arch Intern Med.* 161:2378-81.
- 2) Ueda K.(2011):Preventing Aspiration Pneumonia by OralHealth Care. *JMAJ* 54(1): 39–43
- 3) Doty R.W., Bosma J.F.(1956):An electromyographic analysis of reflex deglutition. *J Neurophysiol.* 19:44-60.
- 4) Jean A., Kessler J.P., and Tell F.(1994):Nucleus tractus solitarii and deglutition:monoamines, excitatory amino acids and cellular properties. *In: Nucleus of the Solitary Tract*, edited by Baracco R.A. Boca Raton, FL: CRC, p. 361–375.
- 5) Wang Y.T., Bieger D.(1991):Role of solitariat GABAergic mechanisms in control of swallowing. *Am J Physiol.* 261:R639-46.
- 6) Kessler J.P., Cherkaoui N., Catalin D., Jean A.(1990):Swallowing responses induced by microinjection of glutamate and glutamate agonists into the nucleus tractus solitarius of ketamine-anesthetized rats. *Exp Brain Res.* 83:151-8.
- 7) Félix B., Jean A., Roman C.(2006) :Leptin inhibits swallowing in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 291:R657-63.
- 8) Bariohay B., Tardivel C., Pio J., Jean A., Félix B. (2008):BDNF-TrkB signaling interacts with the GABAergic system to inhibit rhythmic swallowing in the rat.*Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 295:R1050-9.
- 9) Jean A. (2001):Brain stem control of swallowing: neuronal network and cellular mechanisms. *Physiol Rev.* 81:929-69.
- 10) Lang IM.(2009):Brain stem control of the phases of swallowing.*Dysphagia.* 24:333-48.
- 11) Paton J.F.(1996):A working heart-brainstem preparation of the mouse.*J Neurosci Methods.*

65:63-8.

12) Wilson R.J., Remmers J.E., Paton J.F.(2001):Brain stem PO₂ and pH of the working heart-brain stem preparation during vascular perfusion with aqueous medium. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 281:R528-38.

13) Paton J.F.(1996):The ventral medullary respiratory network of the mature mouse studied in a working heart-brainstem preparation. *J Physiol*. 493:819-31.

14) St-John W.M., Paton J.F.(2000):Characterizations of eupnea, apneusis and gasping in a perfused rat preparation. *Respir Physiol*. 123:201-13.

15) Wang W., Fung M.L., Darnall R.A., St John W.M.(1996):Characterizations and comparisons of eupnoea and gasping in neonatal rats. *J Physiol*. 490:277-92.

16) Okada Y., Mückenhoff K., Holtermann G., Acker H., Scheid P.(1993):Depth profiles of pH and PO₂ in the isolated brain stem-spinal cord of the neonatal rat. *Respir Physiol*. 93:315-26.

17) St -John W.M., Rybak I.A.(2002):Influence of levels of carbon dioxide and oxygen upon gasping in perfused rat preparation. *Respir Physiol*. 129:279-87.

18) Paton J.F.,Kasparov S.(1999):Differential effects of angiotensin II on cardiorespiratory reflexes mediated by nucleus tractus solitarii – a microinjection study in the rat. *J Physiol*. 521:213–225.

19) Pinard E., Rigaud A.S., Riche D., Naquet R., Seylaz J.(1987):Continuous determination of the cerebrovascular changes induced by bicuculline and kainic acid in unanaesthetized spontaneously breathing rats. *Neuroscience*. 23:943-52.

20) Doty R.W.(1968):Neural organization of deglutition. *Handbook of Physiology. The Alimentary Canal. Am Physiol Soc Washington, DC*, sect. VI, vol. IV,p. 1861–1902.

21) Mrini A., Jean A.(1995):Synaptic organization of the interstitial subdivision of the nucleus tractus solitarii and of its laryngeal afferents in the rat. *J Comp Neurol*. 355:221-36.

22) Baude A., Strube C., Tell F., Kessler J.P.(2009):Glutamatergic neurotransmission in the

nucleus tractus solitarii: structural and functional characteristics. *J Chem Neuroanat.* 38:145-53.

23) Chen C.Y., Ling E.H., Horowitz J.M., Bonham A.C.(2002):Synaptic transmission in nucleus tractus solitarius is depressed by Group II and III but not Group I presynaptic metabotropic glutamate receptors in rats. *J Physiol.* 538:773-86.

24) Kessler J.P., Cherkaoui N., Catalin D., Jean A.(1990):Swallowing responses induced by microinjection of glutamate and glutamate agonists into the nucleus tractus solitarius of ketamine-anesthetized rats. *Exp Brain Res.* 83:151-8.

25) Jean A.(2001) :Brain stem control of swallowing: neuronal network and cellular mechanisms. *Physiol Rev.* 81:929-69.

26) Batten T.F., Pow D.V., Saha S.(2010):Co-localisation of markers for glycinergic and GABAergic neurones in rat nucleus of the solitary tract: implications for co-transmission. *J Chem Neuroanat.* 40:160-76.

27) Broussard D.L., Li X., Altschuler S.M..(1996):Localization of GABA_A alpha 1 mRNA subunit in the brainstem nuclei controlling esophageal peristalsis. *Brain Res Mol Brain Res.* 40:143-7.

28) Hinckley C., Seebach B., Ziskind-Conhaim L.(2005) :Distinct roles of glycinergic and GABAergic inhibition in coordinating locomotor-like rhythms in the neonatal mouse spinal cord. *Neuroscience.* 131:745-58.

29) Schmid K., Böhmer G., Gebauer K.(1991):Glycine receptor-mediated fast synaptic inhibition in the brainstem respiratory system. *Respir Physiol.* 84:351-61.

30) Dufour A., Tell F., Kessler J.P., Baude A.(2010):Mixed GABA-glycine synapses delineate a specific topography in the nucleus tractus solitarii of adult rat. *J Physiol.* 588:1097-115.

31) Wang Y.T., Bieger D.(1991):Role of solitarily GABAergic mechanisms in control of swallowing. *Am J Physiol.* 261:R639-46.

32) 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.

33) Harada H., Takakusaki K., Kita S., Matsuda M., Nonaka S., Sakamoto T.(2005):Effects of injecting GABAergic agents into the medullary reticular formation upon swallowing induced by the superior laryngeal nerve stimulation in decerebrate cats. *Neurosci Res.* 51:395-404

34) Büsselberg D., Bischoff A.M., Paton J.F., Richter D.W.(2001):Reorganisation of respiratory network activity after loss of glycinergic inhibition. *Pflugers Arch.* 441:444-9.

35) Takazawa T., MacDermott A.B.(2010):Glycinergic and GABAergic tonic inhibition fine tune inhibitory control in regionally distinct subpopulations of dorsal horn neurons. *J Physiol.* 588:2571-87.

36) Khawaled R., Bruening-Wright A., Adelman J.P., Maylie J.(1999):Bicuculline block of small-conductance calcium-activated potassium channels. *Pflugers Arch.* 438:314-21.

37) Stocker M.(2004):Ca(2+)-activated K⁺ channels: molecular determinants and function of the SK family. *Nat Rev Neurosci.* 5:758-70.

38) Lin M., Hatcher J.T., Chen Q.H., Wurster R.D., Cheng Z.J.(2010):Small conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels regulate firing properties and excitability in parasympathetic cardiac motoneurons in the nucleus ambiguus. *Am J Physiol Cell Physiol.* 299:C1285-98.

39) García-Colunga J., Miledi R.(1999)Modulation of nicotinic acetylcholine receptors by strychnine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:4113-8.

40) Albuquerque E.X., Pereira E.F., Braga M.F., Matsubayashi H., Alkondon M.(1998):Neuronal nicotinic receptors modulate synaptic function in the hippocampus and are sensitive to blockade by the convulsant strychnine and by the anti-Parkinson drug amantadine. *Toxicol Lett.* 102-103:211-8.

41) Ferreira M., Ebert S.N., Perry D.C., Yasuda R.P., Baker C.M., Dávila-García M.I., Kellar K.J., Gillis R.A.(2001):Evidence of a functional alpha7-neuronal nicotinic receptor subtype located on motoneurons of the dorsal motor nucleus of the vagus. *J Pharmacol Exp Ther.* 296:260-9.

42) Matsubayashi H., Alkondon M., Pereira E.F., Swanson K.L., Albuquerque E.X.(1998):Strychnine: a potent competitive antagonist of alpha-bungarotoxin-sensitive nicotinic acetylcholine receptors in rat hippocampal neurons. *J Pharmacol Exp Ther.* 284:904-13.

43) Büsselberg D., Bischoff A.M., Paton J.F., Richter D.W.(2001):Reorganisation of respiratory network activity after loss of glycinergic inhibition. *Pflugers Arch.* 441:444-9.

44) Johnson J.W., Ascher P.(1987):Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature.* 325:529-31.

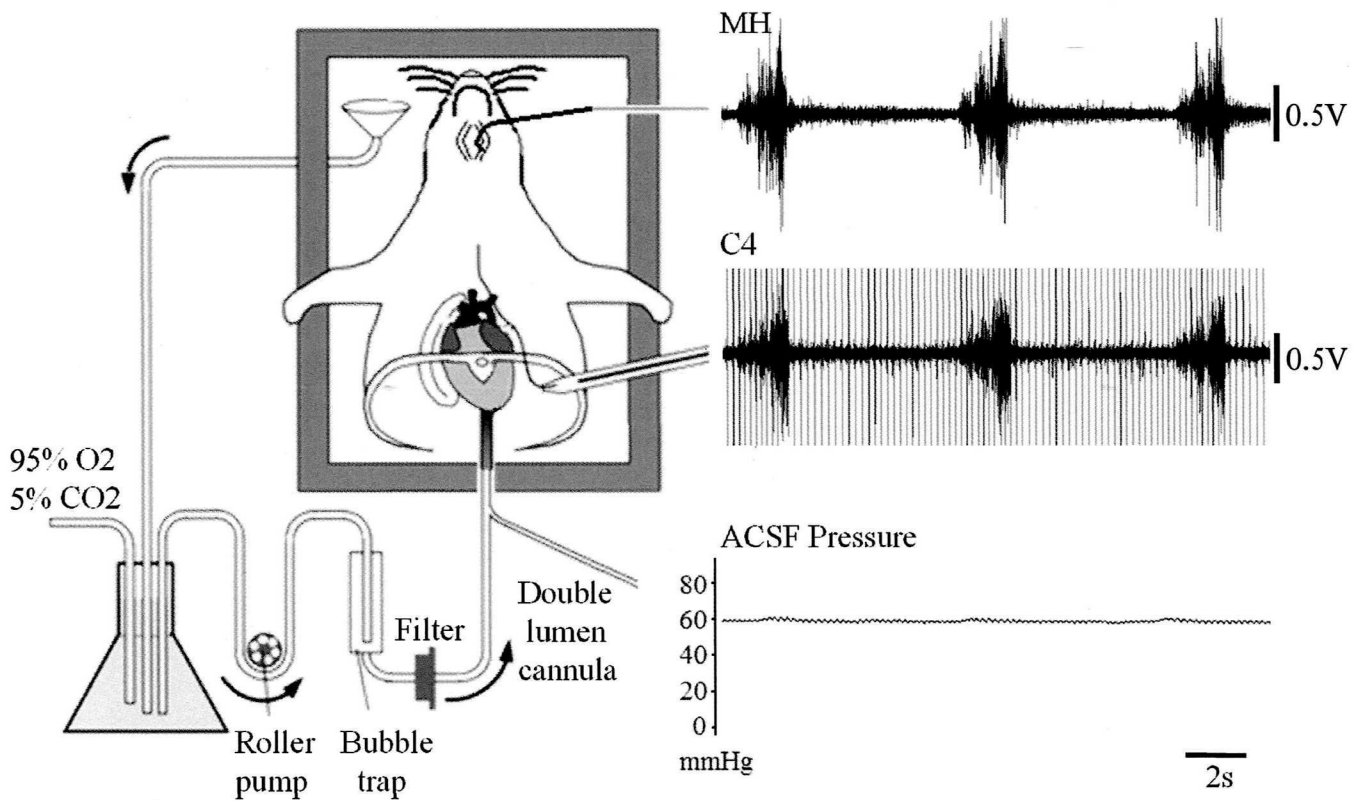


図1 Juvenile rat working heart-brainstem preparation

図にはチャンバーに設置した標本と、灌流システムを示す。標本への灌流は、下行大動脈に固定したカテーテルより毎分20-28mlの速度で行った。脈管より組織外へ漏出した灌流液はチャンバーに集められた後に、還流システムによって再灌流した。ダブルルーメンカテーテルから持続的に人工脳脊髄液灌流圧 (artificial cerebrospinal fluid pressure; ACSF pressure) の測定を行い、灌流圧が60-80mmHgとなるように灌流液の流速を調節した。図に示すように、顎舌骨筋からの筋電図 (Mylohyoid Muscle; MH) および横隔神経 (C4) の神経活動を同時記録した。図右上にそれぞれの活動記録を示す。安静時には、約7秒に一回の周期性を持つ呼吸活動が、MHおよびC4双方に同期して認められた。

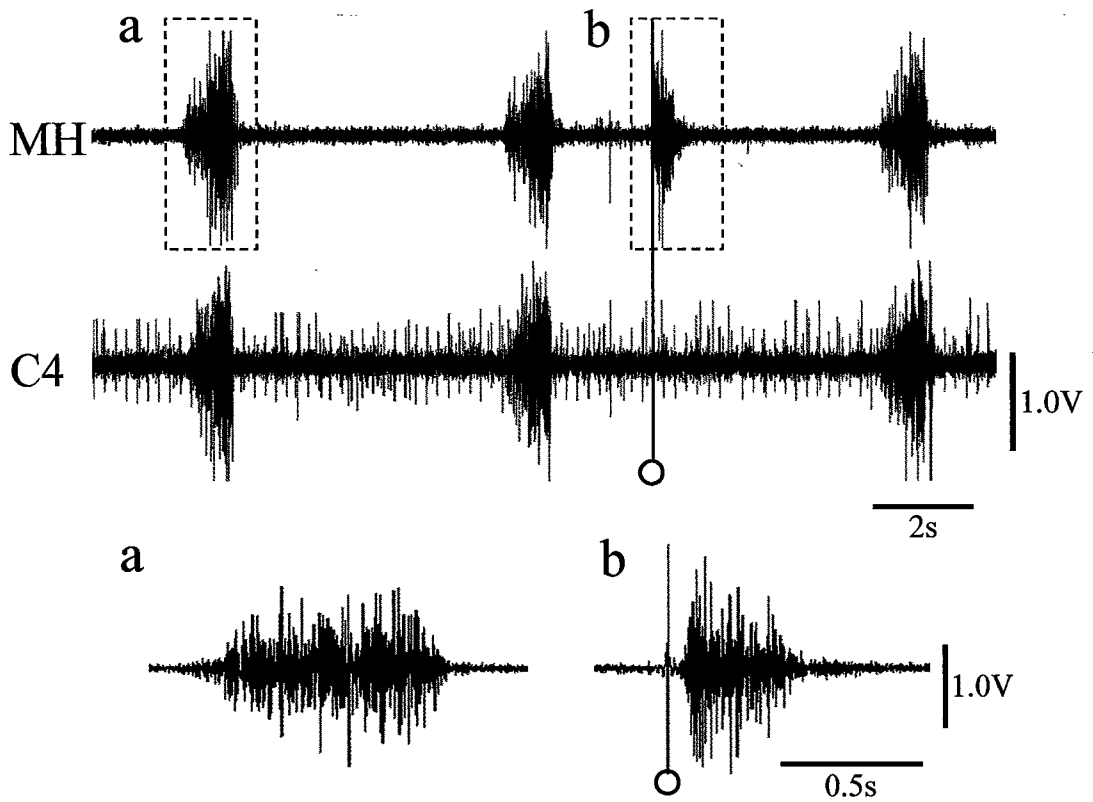


図2 SLN電気刺激時の顎舌骨筋と横隔神経の活動の記録

安定した呼吸活動(a)が出現しているWHBP標本の片側SLNに対して、単発電気刺激(Duration 1.0ms、Intensity 5.0V)を加えると、刺激反応性にC4の活動とは同期しないMHの筋活動を認めた(b)。MH筋電図では自発的な呼吸活動が漸増型活動パターン(a)を示すのに対し、SLNへの刺激反応性に出現した活動は漸減型活動パターン(b)を示した。図中○は電気刺激を示す。

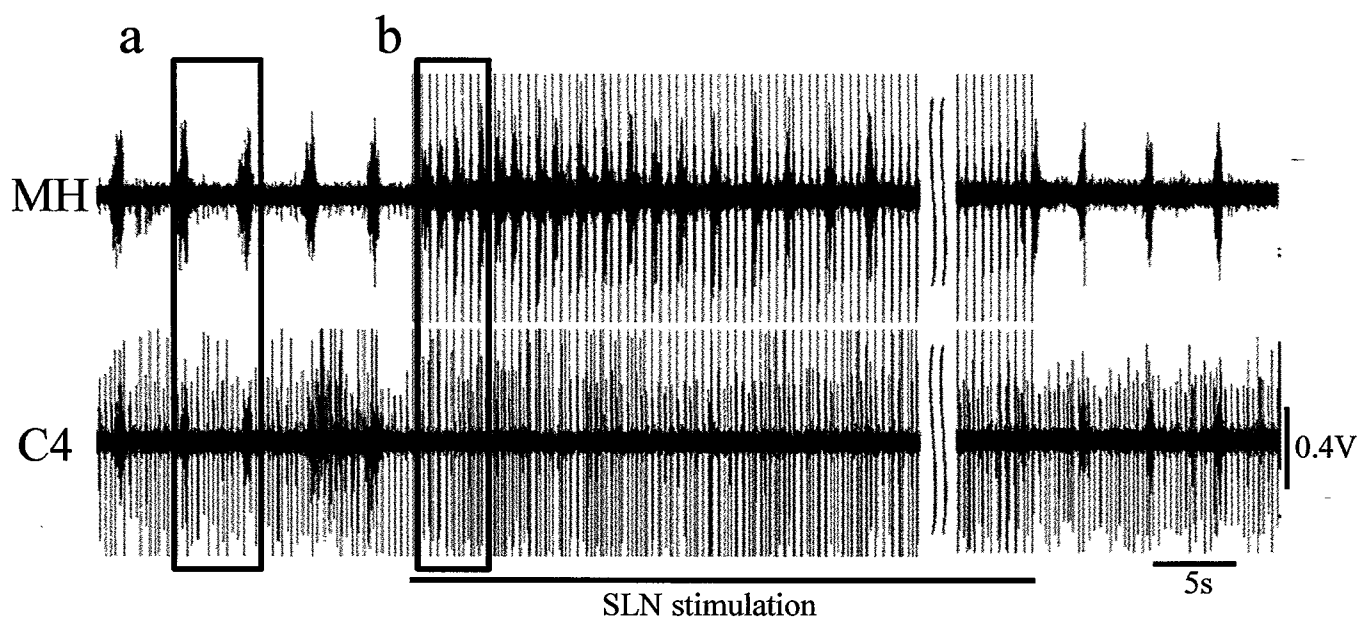


図3 SLN連続刺激時の顎舌骨筋と横隔神経の活動記録

上段の2トレースは、片側SLNへ連続刺激 (Intensity 5.0V、Duration 1.0ms、Frequency 2Hz)を加えた際(下線;SLN stimulation)のMHおよびC4の同時記録を示す。SLNに対する刺激に反応してMHからは連続的な刺激反応性の活動が出現したが、C4及びMHから記録されていた自発的な呼吸活動は消失した。下段の2トレースは上段中a及びbの拡大を示す。aでは呼吸活動が記録されているが、bでは消失していることが分かる。図中▲は呼吸活動を、○は電気刺激、△は心拍、●はSLN刺激反応性活動を示す。

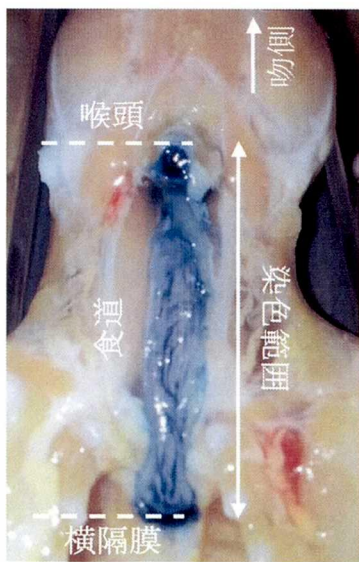
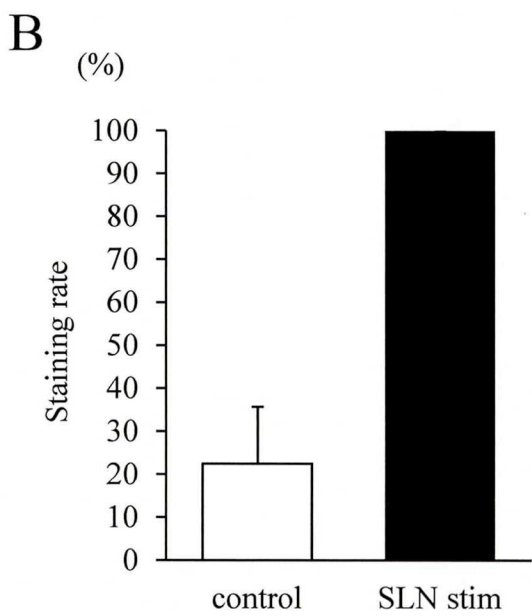
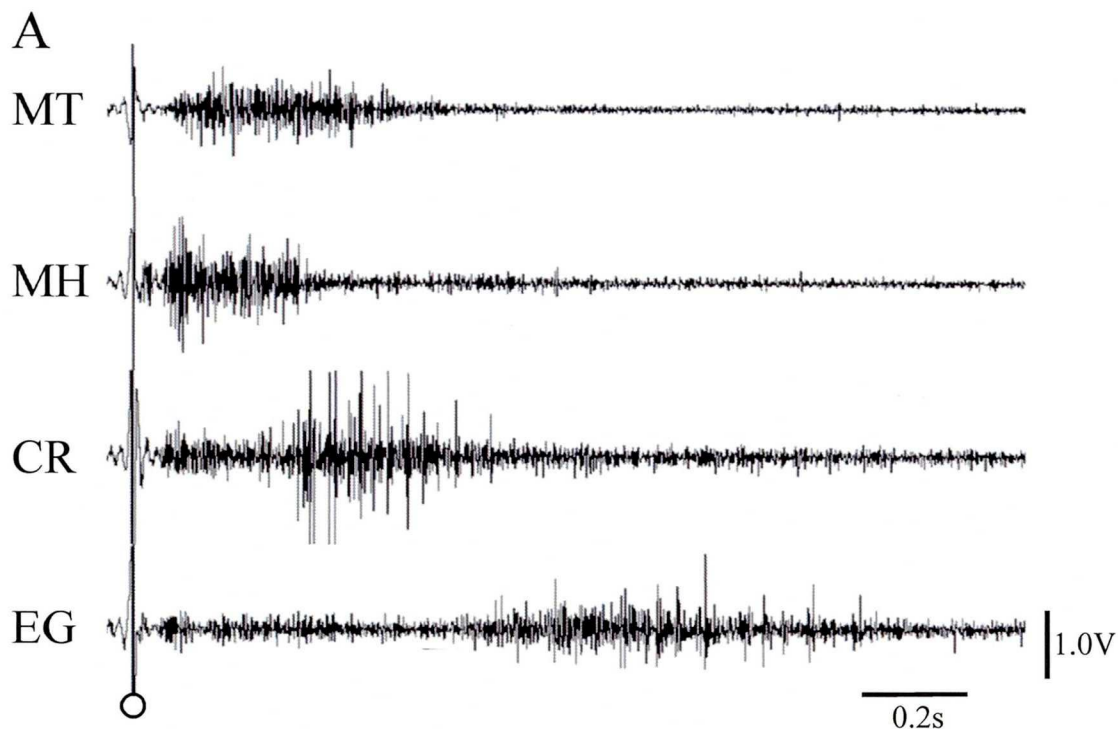


図4 片側SLN電気刺激反応性活動の解析

Aには、片側SLN単発刺激時の咬筋(MT)、MH、中咽頭収縮筋(CR)、および上部食道筋(EG)から記録した筋電図を示す。SLN電気刺激に反応して、MTおよびMHが最も早く活動し、次いでCR、最後にEGが活動する口腔から食道へのシーケンス活動を認めた。○は片側SLNに対する単発電気刺激を示す。Bの右写真は標本から剖出した食道を示す。口腔内に5%ポンタミンスカイブルーを入れ片側SLNに対して複数回の単発電気刺激を行った。刺激反応性の活動と共に口腔内の染色液が食道尾側端まで輸送され、食道が全域にわたり染色された。Bの左グラフは、SLN刺激を行わず、自発的な呼吸活動のみ発現している状態で10分間放置した場合の食道の染色範囲をコントロールとし、SLN刺激時とを比較した(n=4)。コントロール群では食道染色範囲は22.5±13.1%であったのに対し、SLN刺激反応性活動を誘発した群では、すべての実験標本において食道内は全域にわたり染色された(100±0%)

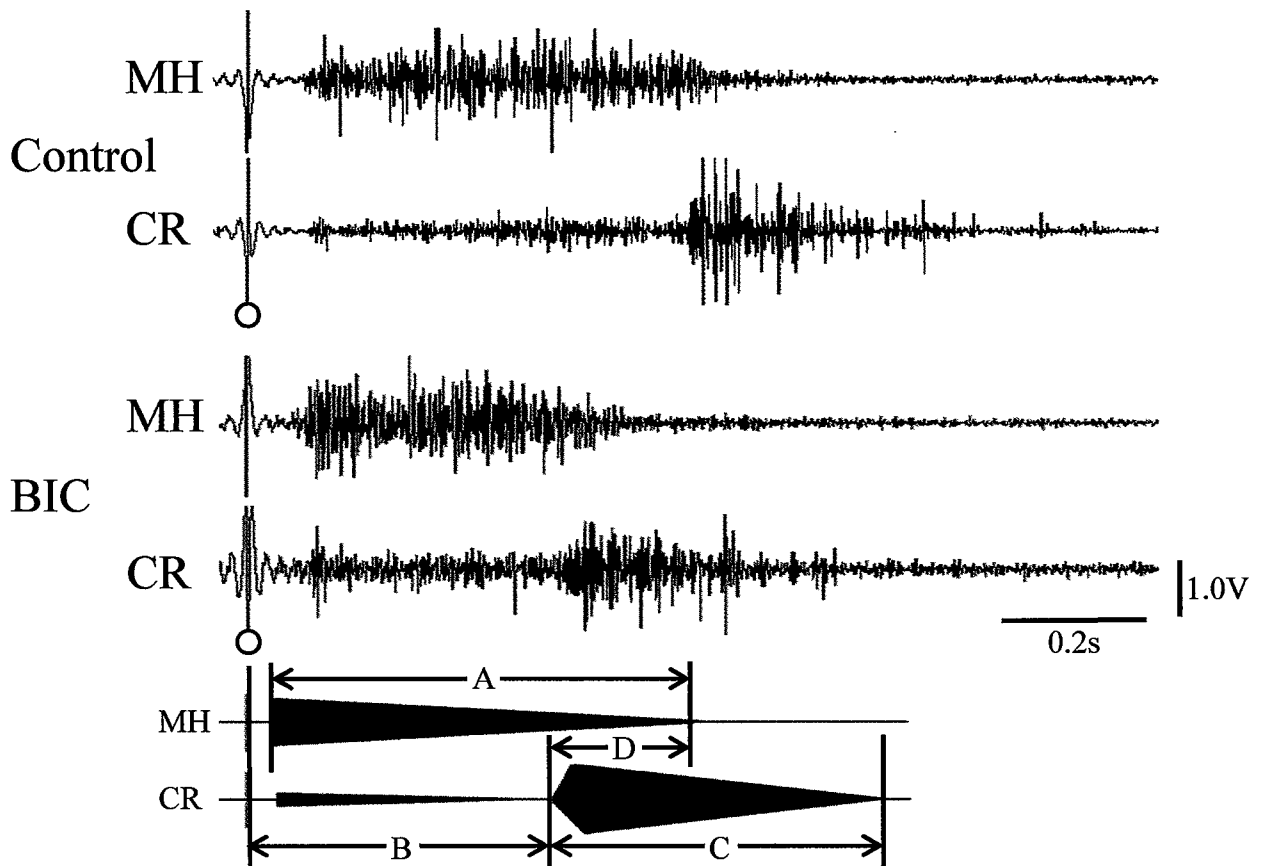


図5 BIC投与前後の顎舌骨筋および中咽頭収縮筋の筋活動記録

BIC (0.2 μ M) 投与前後のMHとCRの筋活動を示す。最下段シェーマ内に計測項目を示した。計測項目は以下の通りである、A:MH活動時間、B:片側SLN刺激からCR活動開始までの時間、C:CR活動時間、D:MHとCRの活動が重複する時間。○は片側SLNに対する単発電気刺激を示す。

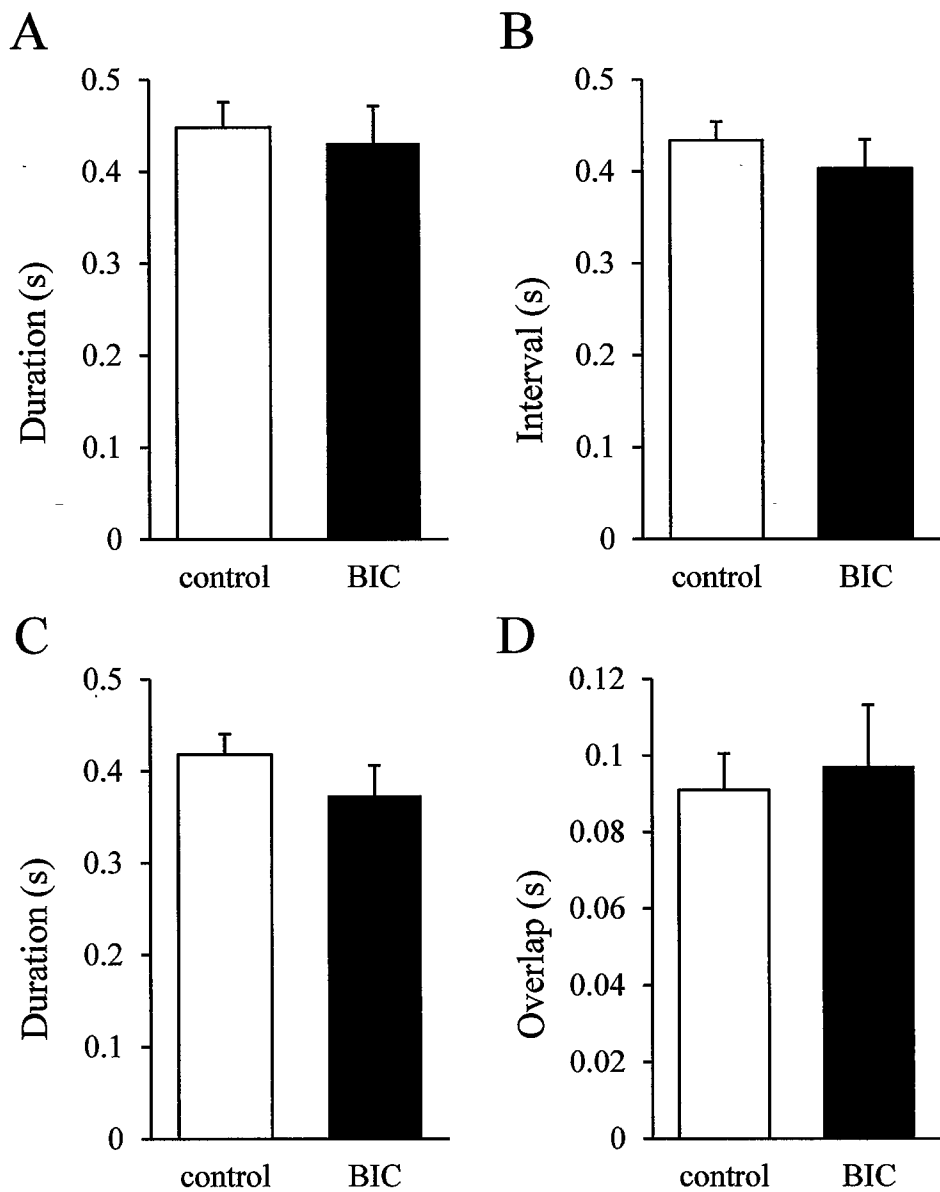


図6 BIC投与によるMHとCRの活動パターンの変化

MHとCR同時記録におけるBIC投与前後の活動パターンの変化を示す (n=6)。BIC投与では、A (MH活動時間)、B (片側SLN単発電気刺激からCR活動開始までの時間)、C (CRの活動時間)、D (MHとCRの活動が重複する時間)の全ての計測項目で統計学的に有意な変化は認めなかった。

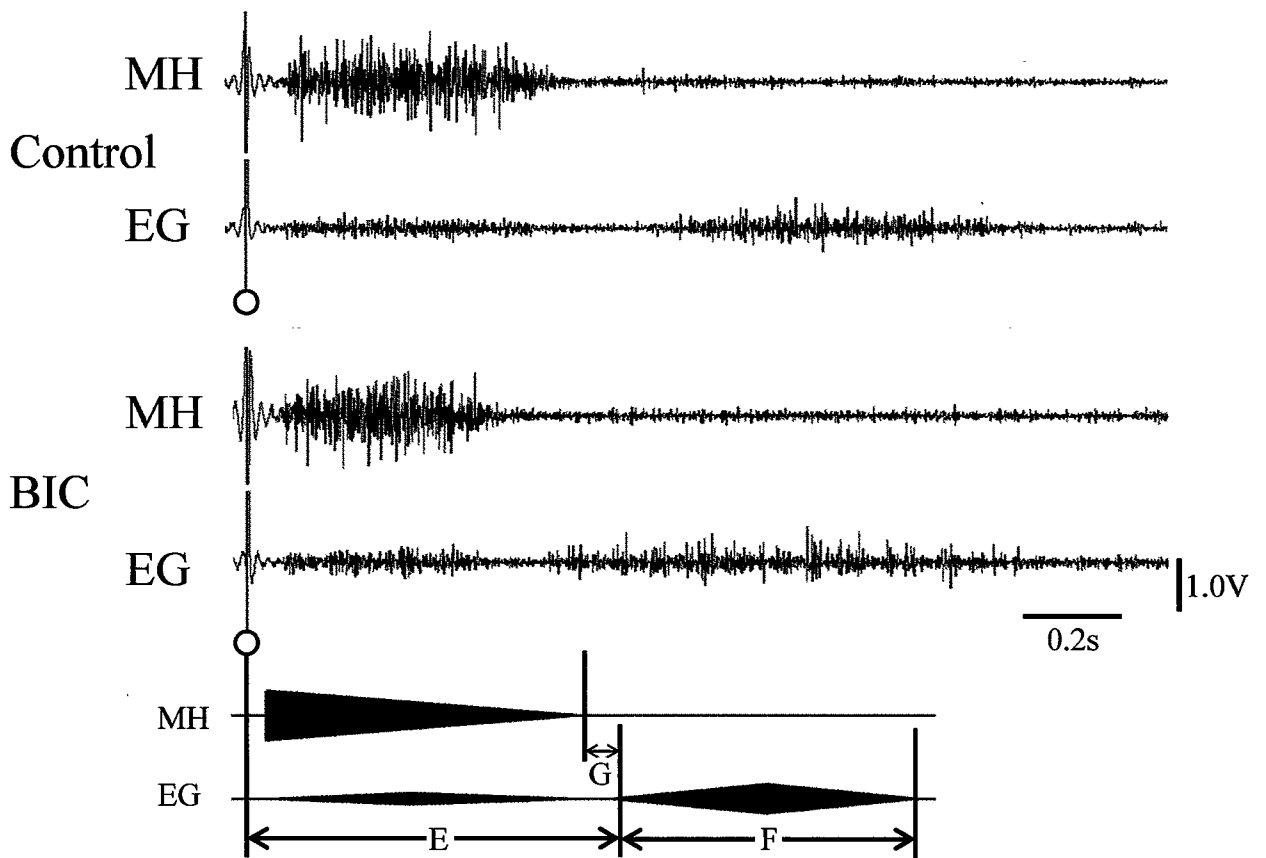


図7 BIC投与前後の顎舌骨筋および上部食道筋の筋活動記録

BIC ($0.2\mu\text{M}$) 投与前後のMHとEGの筋活動を示す。最下段のシェーマ内に計測項目を示した。計測項目は以下の通りである。E:片側SLN刺激からEG活動開始までの時間、F:EG活動時間、G:MH活動終了からEG活動開始までの時間。○は片側SLNに対する単発電気刺激を示す。

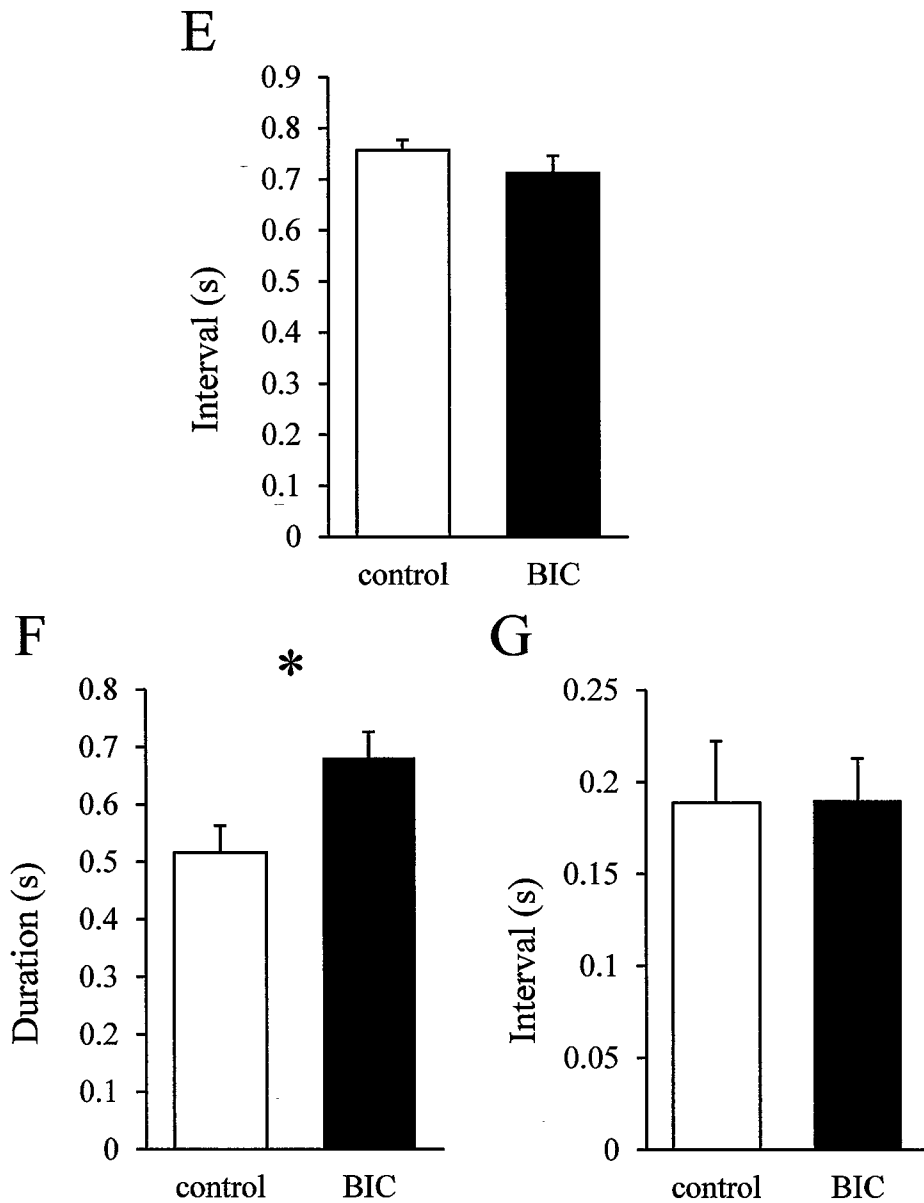


図8 BIC投与によるMHとEGの活動パターンの変化

MHとEG同時記録におけるBIC投与前後の活動パターンの変化を示す(n=5)。BIC投与により、FのEG活動時間が統計学的有意に延長した(* $p < 0.05$)。E(片側SLN刺激からEG活動開始までの時間)およびG(MH活動終了からEG活動開始までの時間)には明らかな変化は認めなかった。

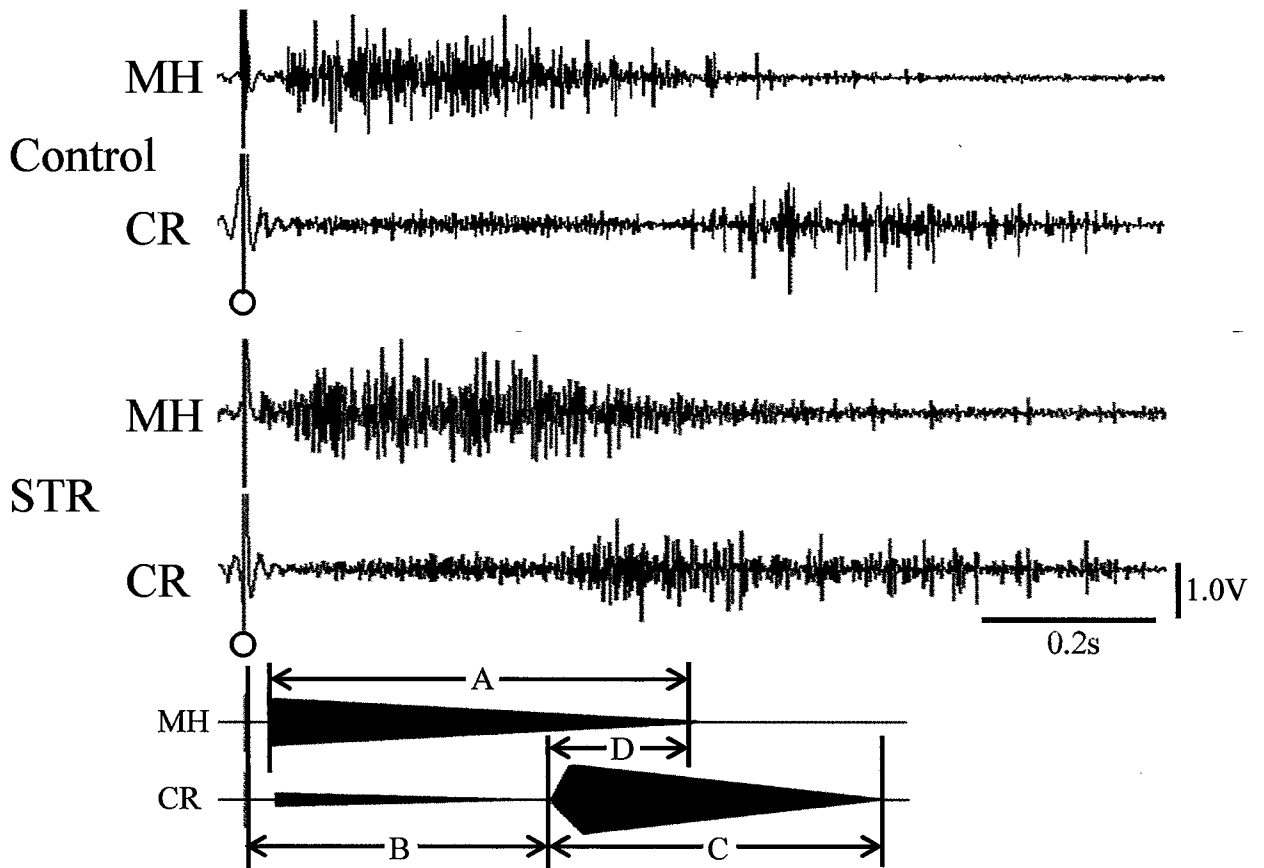


図9 STR投与前後の顎舌骨筋および中咽頭収縮筋の筋活動記録

STR (0.04 μ M) 投与前後のMHとCRの筋活動を示す。最下段のシェーマ内に計測項目を示した。計測項目は以下の通りである、A:MH活動時間、B:片側SLN単発電気刺激からCR活動開始までの時間、C:CRの活動時間、D:MHとCRの活動が重複する時間。○は片側SLNに対する単発電気刺激を示す。

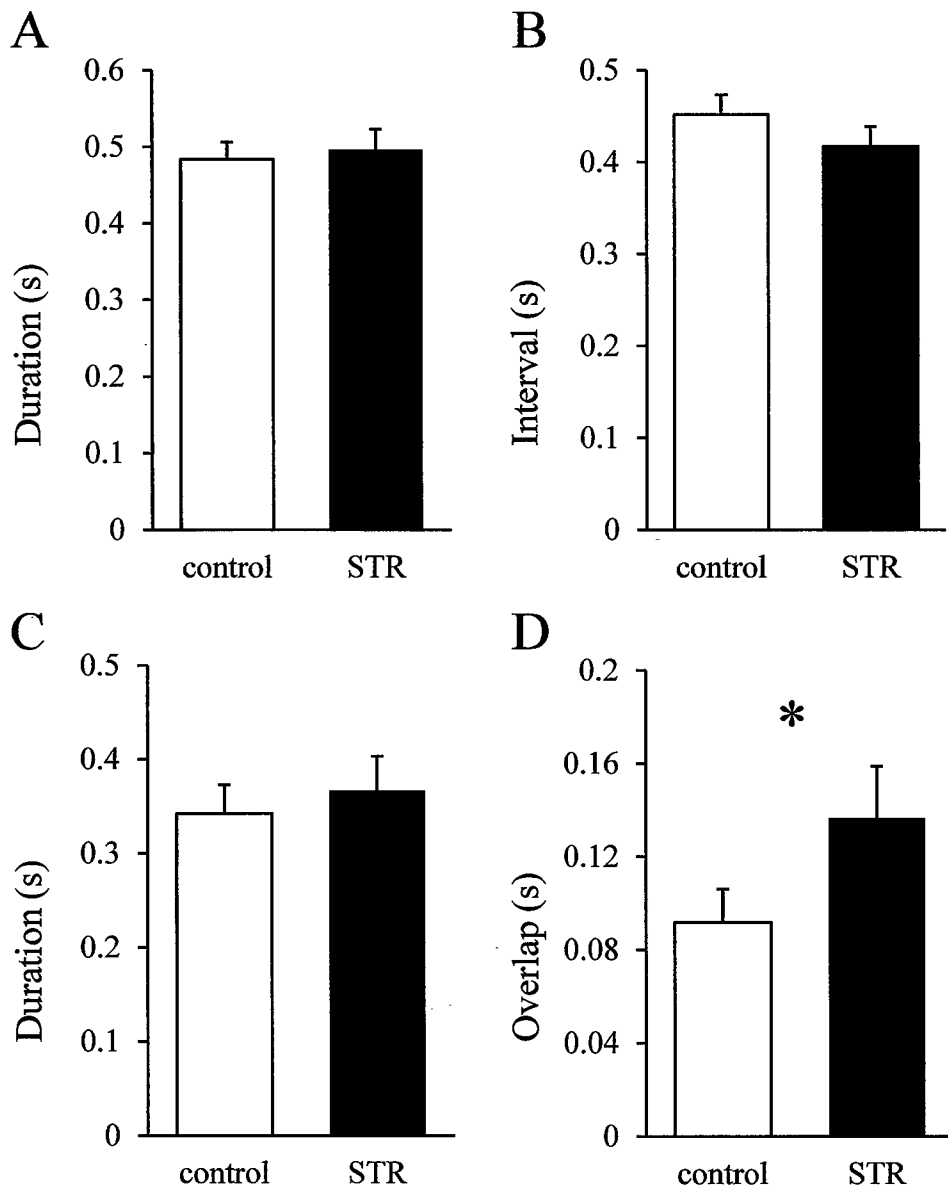


図10 STR投与前後におけるMHとCRの活動パターンの変化

MHとCR同時記録におけるSTR投与前後の活動パターンの変化を示す(n=8)。STR投与によって、DのMHとCRの活動が重複する時間が統計学的有意に延長した(* $p < 0.05$)。A(MH活動時間)、B(片側SLN単発電気刺激からCR活動開始までの時間)およびC(CRの活動時間)には明らかな変化は認めなかった。

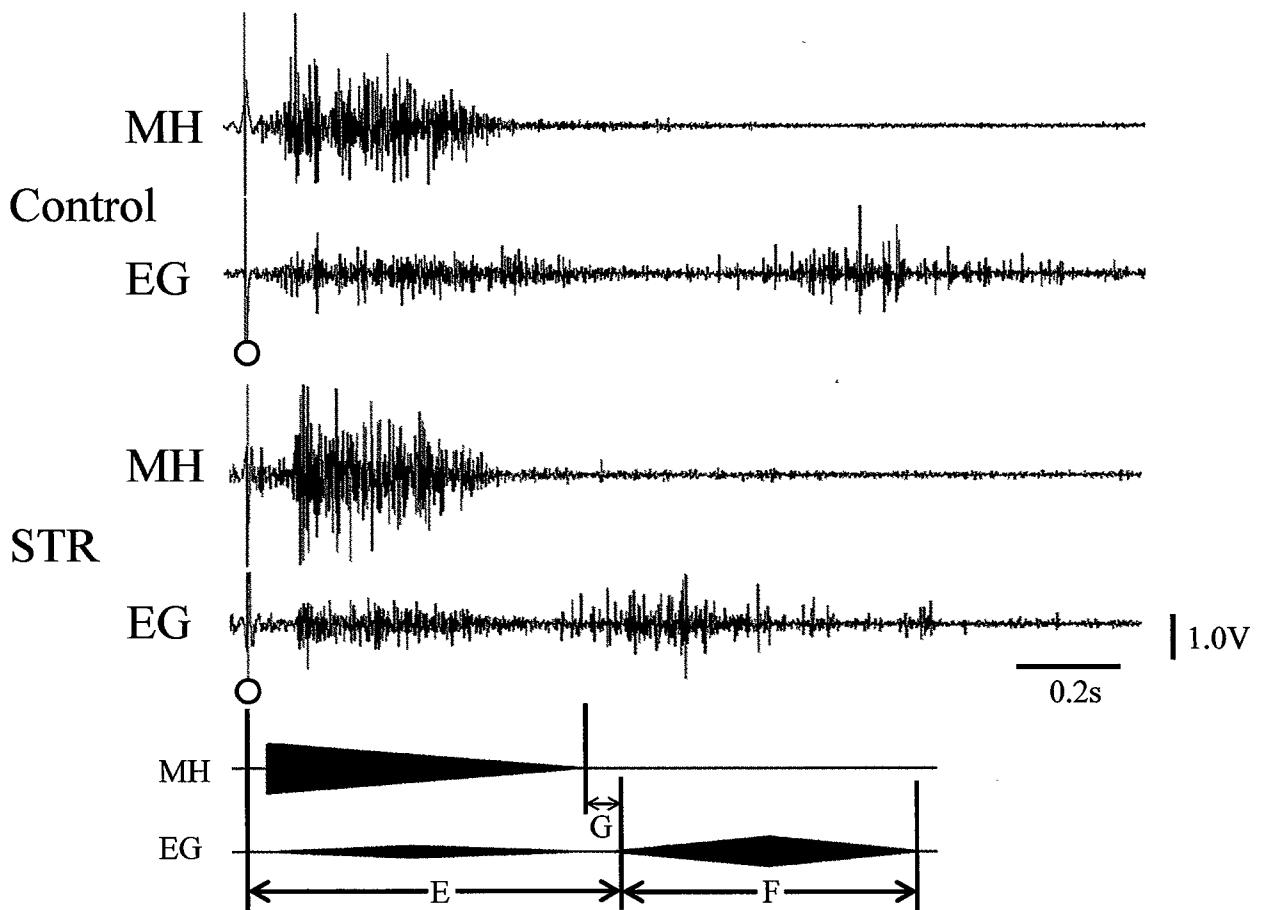


図11 STR投与前後の顎舌骨筋および上部食道筋の筋活動記録

STR (0.04 μ M) 投与前後のMHとEGの筋活動を示す。最下段のシェーマ内に計測項目を示した。計測項目は以下の通りである。E:片側SLN刺激からEG活動開始までの時間、F:EG活動時間、G:MH活動終了からEG活動開始までの時間。○は片側SLNに対する単発電気刺激を示す。

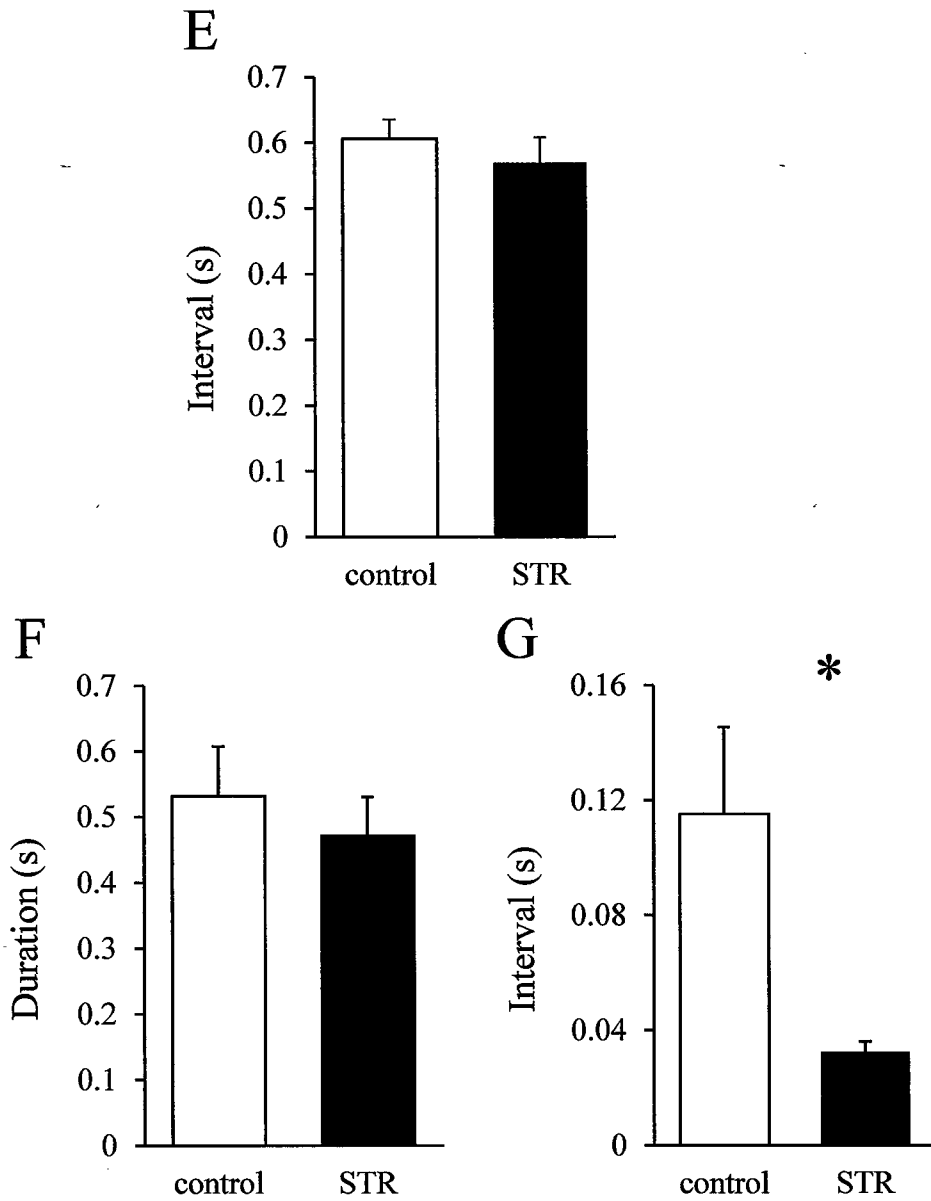


図12 STR投与前後のMHとEGの活動パターンの変化

MHとEG同時記録におけるSTR投与前後の活動パターンの変化を示す(n=8)。STR投与によって、G(MH活動終了からEG活動開始までの時間)が統計学的有意に短縮した(* $p < 0.05$)。E(片側SLN刺激からEG活動開始までの時間)およびF(EG活動時間)には著明な変化を認めなかった。

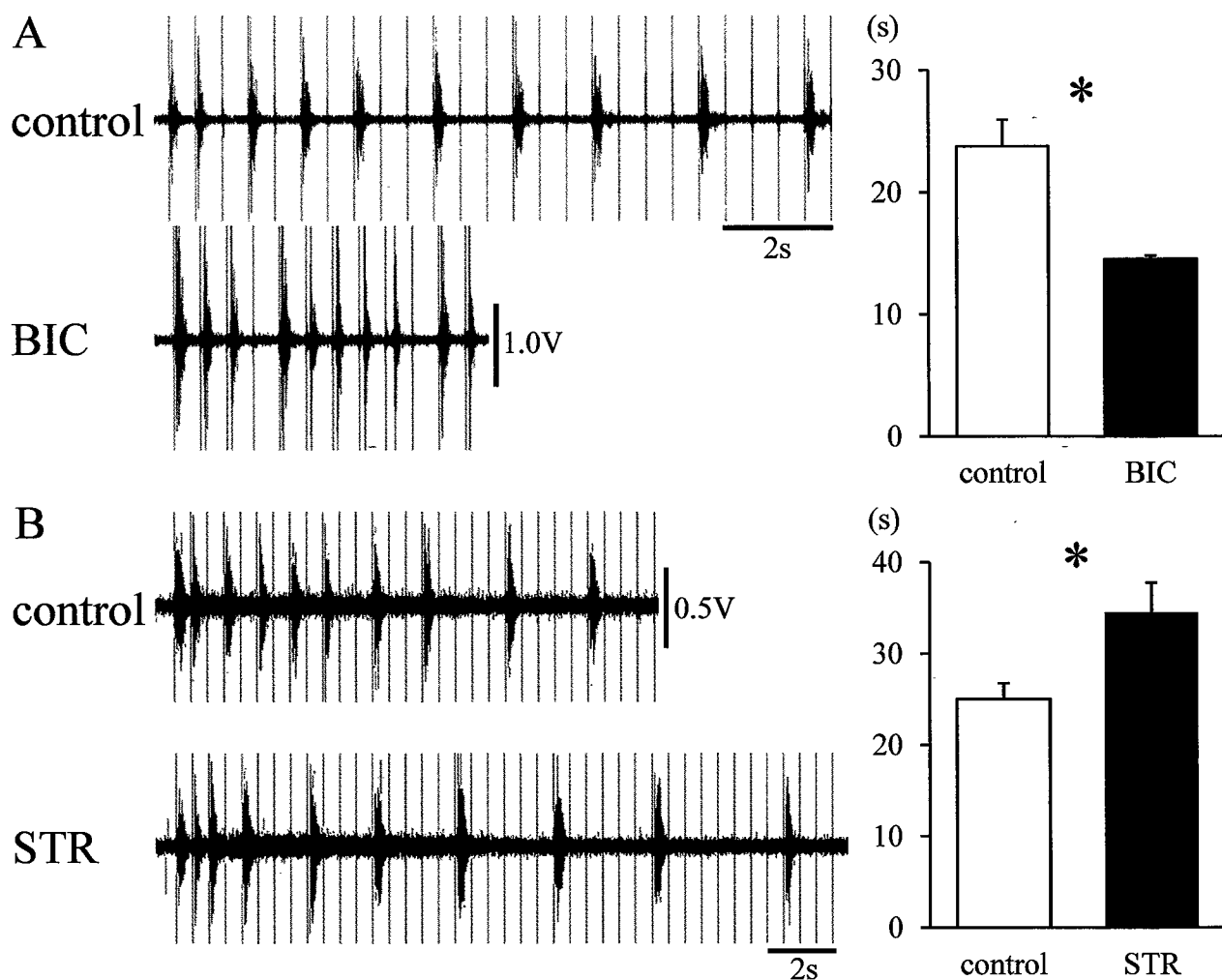


図13 薬剤投与前後における連続嚔下発現頻度の変化

片側SLNに対して加えた連続電気刺激 (Intensity5.0V、Duration1.0ms、Frequency1Hz) に反応して出現する連続性の嚔下活動について、薬剤投与前後での発現頻度の変化を検討した。図左トレースには薬剤投与前後においてMHに記録された連続嚔下活動を示す。全てのトレースは10回の連続嚔下活動を含んでいる。AはBIC (0.2μM) 投与前後の、BはSTR (0.04μM) 投与前後の記録を示す。AとBのトレースでは時間軸のスケールが異なることに注意。図右グラフに薬剤投与前後において10回連続嚔下に要する時間の変化を示した。BICの投与によって、連続嚔下の発現頻度は著明に増加したのに対し(A右グラフ) (n=4)、STR投与によって連続嚔下の発現頻度は著明に減少した(B右グラフ) (n=4) (*p<0.05)。

