



Title	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
Author(s)	近藤, 敬秀
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/61655
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 (近藤 敬秀)	
論文題名	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
論文内容の要旨	
<p>[緒言]</p> <p>嚥下活動は、上気道において呼吸と食物輸送のスイッチを担う複雑な反射運動であり、生命維持に非常に重要な運動であるが、その複雑な協調運動がプログラムされている中枢神経機構についてはあまり多くのことが知られていない。嚥下活動は、延髄孤束核（NTS）に存在するセントラルパターンジェネレーター（CPG）においてその活動パターンが形成される。しかしながら、嚥下CPG内における神経ネットワークのアーキテクチャーは不明である。またCPG内の主要な興奮性または抑制性伝達を担う神経伝達物質受容体についても多くは知られていない。これまで当研究室では、脳幹内の神経ネットワークが比較的広い範囲で保たれている新生仔ラット延髄en bloc標本や若年ラットin situ標本といった実験標本を用いて、嚥下活動を形成または修飾する中枢神経機構の一端を明らかとしてきた。これらの標本を用いた研究は、実験操作による標本に対する侵襲作用に影響されることがないという利点を持つ一方で、嚥下CPGに対する修飾機構も多く温存されていることから、得られた結果の解釈に多様性を残す。そこで本研究では、嚥下CPGの神経機構をより限局して研究対象とするために、嚥下活動を発現し得る最小の延髄スライス標本を作成することを第一の目的とした。このような研究はこれまでになされていなかったため、本研究結果は嚥下CPG仮説に対する確認ともなり得る。さらに、確立した最小の延髄スライス標本を用いて、嚥下活動を形成するために必須となる主要な興奮性神経伝達物質受容体を明らかにすることを第二の目的として以下の研究を行った。</p> <p>[研究方法]</p> <p>延髄スライス標本の作成：実験には、生後2日齢SD系ラットを用いた。イソフルランによる深麻酔後、最尾側肋骨下で下半身を切断、前頭縫合で前頭部分を切除し、95%O₂・5%CO₂混和ガスで飽和させた4℃人工脳脊髄液（ACSF）内に浸透した。大脳および小脳を除去した後、菱形窩正中溝、顔面神経丘、第四脳室髄條を明示した。脳幹表面から出現する迷走神経および舌下神経を周囲骨組織から切離し、できるだけ長く脳幹組織に残すようにした。脳幹腹側表面の脳底動脈およびその枝を硬膜とともに除去した後、舌下神経および迷走神経を損傷しないようにそれぞれの周囲に残存する硬膜を除去した。舌下神経は、最吻側に出現する左右1対の神経束のみ残した。続いて、脳幹ブロックより、マイクロスライス作成装置を用いてスライス標本を作成した。迷走神経が出現するレベルから100μm吻側の位置をこのスライスの吻側切断面とし、そこから尾側へ600-800μmの100μmごとに尾側切断面を設定し、1個体から1枚の延髄スライス標本を作成した。</p> <p>神経活動の記録：記録用チャンバーをステージ固定式正立顕微鏡のステージ上に設置し、室温下（23-25℃）でACSFを灌流した。神経活動の記録は、先端径調節されたグラスピペットに固定したグラス吸引電極を用いて、延髄スライス標本上の片側の舌下神経を吸引することによって行った。</p> <p>嚥下活動の誘発：嚥下活動を誘発するために①延髄スライス標本に温存した迷走神経に対する電気刺激、②延髄スライス標本内のNTSへGABA_A受容体拮抗薬であるBicuculline（BIC）を局所微量投与する方法をとった。いずれの誘発刺激も、記録を行う舌下神経と同側の迷走神経または片側NTSに対して行った。①迷走神経への電気刺激は先端を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を用いて、スライス標本に温存した迷走神経に対して電気刺激を行った。②片側NTSへのBICの局所微量投与はマイクロマニピレータに固定した薬剤微量投与用シリッジ先端に、先端径を調節したグラスピペットを保持し行った。グラスピペットには、Dimethylsulfoxideに溶解したBICを酸素化したACSFに混和した溶液を満たした。BICの目的投与量は0.2-1.0pmolとした。延髄スライス標本への局所微量投与は、スライスの尾側切断面の表面から150μmの深さまでグラスピペット先端を挿入した位置で行った。</p> <p>延髄スライス標本の評価：実験終了後に600-800μmの厚さの延髄スライス標本を10%中性緩衝ホルマリン液にて固定し、正立顕微鏡で観察した。</p> <p>薬剤投与実験：嚥下活動を発現するために必須となる興奮性神経伝達物質の受容体を調べる目的で、non-NMDA受</p>	

容体拮抗薬であるCNQX、またはNMDA受容体拮抗薬であるAP5を、10 μ MとなるようにACSFに投与し、投与前および投与後10分での嚥下活動の変化を調べた。嚥下活動の誘発は迷走神経の電気刺激によって行った。

[結果および考察]

延髄スライス標本からの嚥下活動の誘発：600 μ mの厚さのスライス標本からは安静時においても、また迷走神経への電気刺激を行った後にも神経活動は記録されなかった。700 μ mの厚さのスライス標本は、安静時に自発的な周期性の呼吸活動を示したものの、迷走神経への電気刺激にて神経活動を誘発できなかった。800 μ mの厚さのスライス標本では、安静時に自発的な呼吸活動を認めたことに加え迷走神経への電気刺激によって呼吸活動とは異なる波形を示す神経活動が誘発された。このスライス標本から記録された呼吸活動と迷走神経への刺激反応性の活動を比較すると、呼吸活動は漸減型活動パターンであるのに対し、迷走神経刺激反応性の活動は漸増型活動パターンの特徴を持つことを示す結果であった。この誘発された神経活動の活動パターン過去にen bloc標本およびin situ標本から誘発された嚥下活動と同様のパターンを示した。片側NTSに対するBICの局所微量投与によって誘発された神経活動について、この神経活動と呼吸活動を比較すると、迷走神経への電気刺激で誘発された神経活動と同様の漸増型活動パターンを持つことを示す結果であった。この活動パターンは当研究室で過去に報告した延髄en bloc標本から同様の方法で誘発した嚥下活動の神経活動と同様の特徴を示したため、本研究において延髄スライス標本から誘発された神経活動は嚥下活動であると考えられた。

延髄スライス標本の解剖学的検討：吻側切断面から尾側へ800 μ mの位置はArea Postrema (AP) にほぼ一致し、解剖学書を参照した結果、本スライス標本内にはAPより吻側のNTS、呼吸中枢 (pre-Bötzing complex)、疑核、舌下神経運動核、迷走神経 (知覚枝) および舌下神経が含まれることが明らかとなった。700 μ mの厚みを設定したスライス標本では、嚥下性活動は誘発されなかったことから、厚さ800 μ mのスライスのAPのレベルから吻側へ100 μ mの組織中に迷走神経の電気刺激により嚥下活動を誘発するための最小回路に必須の領域が含まれている可能性が考えられた。

嚥下活動による呼吸活動の活動間隔の延長：厚さ800 μ mの標本から嚥下活動を誘発すると、周期性呼吸活動の活動間隔の延長を認めた。嚥下活動が呼吸活動を一過性に抑制することは、臨床的にもswallowing apneaとしてよく知られており、今回の結果は、嚥下活動を発現する最小のスライス標本においても、延髄組織が保存された標本と同程度のswallowing apneaを示すことを示唆するものであり、swallowing apneaは本研究で用いた800 μ mの延髄スライス標本内の神経ネットワークで形成され得る可能性が考えられた。

薬剤投与による嚥下活動の変化：800 μ mの厚さの延髄スライス標本へCNQXを投与することにより自発的な呼吸活動が消失した。一方、迷走神経への電気刺激によって誘発した嚥下活動はCNQXの投与によって抑制はされたものの、完全に消失することはなかった。CNQX投与前後での嚥下活動の変化を比較すると活動時間、最大振幅、刺激に対する嚥下活動の発現率いずれも有意に減少したが、嚥下活動の発現は残存した。AP5の投与によって、呼吸活動に著明な変化は認めなかった一方で、迷走神経への電気刺激による嚥下活動の誘発は完全に抑制された。嚥下活動の変化を比較すると、呼吸活動についてはAP5投与前後で活動時間、最大振幅共に有意差は認めなかった一方で、AP5投与後は嚥下活動の発現が完全に抑制された。AP5投与前後における呼吸活動の活動間隔を計測すると、AP5投与前における迷走神経への電気刺激によって嚥下活動が発現した時は呼吸活動の活動間隔が延長したのに対し、AP5を投与することによって嚥下活動の発現をブロックした状態で同じ迷走神経刺激を加えた場合には呼吸活動の活動間隔の延長は認めなかった。この結果は、呼吸活動の発現にはnon-NMDA受容体が必須であるのに対して、嚥下活動の誘発にNMDA受容体が必須であることを示唆する結果であった。NTSにはNMDA受容体およびnon-NMDA受容体の両方が存在し、嚥下活動のトリガーにはNMDA受容体およびnon-NMDA受容体の双方が関与することが示されている。従って、本研究によってAP5によって遮断されたのは、嚥下活動を形成する局所回路内のシグナル伝達あるいは、形成された嚥下活動が舌下神経運動核へ伝達される経路である可能性が推察される。すなわち、APより尾側100 μ mに位置するNTSの亜核間の局所回路または、これらの局所回路から舌下神経運動核への伝達回路における興奮性シグナルのいずれかにおいてNMDA受容体が主要な役割を果たしていることが推察された。

[結論]

本研究によって、生後2日目のSDラットからArea Postrema (AP) より吻側のNTS、舌下神経運動核、迷走神経および舌下神経を含んだ厚さ800 μ mの延髄スライス標本から、嚥下活動を安定して誘発できることが明らかとなった。さらに同延髄スライス標本を用いた薬剤投与実験により、嚥下活動はその発現にNMDA受容体が主要な役割を果たすことが示唆された。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (近 藤 敬 秀)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教授	古 郷 幹 彦
	副 査	教授	田 熊 一 徹
	副 査	准教授	豊 田 博 紀
	副 査	講師	工 藤 千 穂
論文審査の結果の要旨			
<p>本研究は、嚙下活動を発現し得る最小の延髄スライス標本を作成し、嚙下活動に関わる興奮性神経伝達物質受容体を検討したものである。</p> <p>Area Postrema より吻側の孤束核、舌下神経運動核、迷走神経および舌下神経を含んだ厚さ 800μm の延髄スライス標本から安定した誘発性の嚙下活動が可能であった。薬剤投与実験により嚙下活動はその発現に、孤束核に存在する NMDA 受容体が主要な役割を果たすことを示唆した。</p> <p>本研究は新たな実験手法を作成し、嚙下活動発現のメカニズムの一部を明らかにしたという点で、博士（歯学）の学位論文として価値のあるものと認める。</p>			