



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	<a href="https://doi.org/10.18910/61655">https://doi.org/10.18910/61655</a>
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

## 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

2017年1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  
近藤敬秀

## 緒言

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<sup>1)</sup>。嚥下活動の障害により引き起こされる誤嚥性肺炎は、本邦の死因第3位である肺炎<sup>2)</sup>の80%に関わる<sup>3)</sup>と言われており、超高齢化を迎えたわれわれの社会において重大な問題である。このように重要な嚥下活動であるが、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<sup>4,5)</sup>。

嚥下活動は、延髄孤束核 (nucleus tractus solitarius; NTS) に存在するセントラルパターンシエネレーター (central pattern generator; CPG) においてその活動パターンが形成される<sup>6,7,8,9)</sup>。形成された活動パターンは疑核周辺の二次中枢で中継され、関連する運動神経核へ分配されると考えられている<sup>4,6,7,10,11,12)</sup>。迷走神経および舌咽神経の求心性線維の一部は、NTS およびその周辺に存在する嚥下活動のトリガーを担う神経細胞へ投射すされ<sup>7,8,13,14,15)</sup>、この神経細胞は興奮性アミノ酸 N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) 感受性であることが知られている<sup>16,17,18)</sup>。また、NTS 周辺の外側網様体から  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) やグリシンによる抑制性制御を受けていることが知られている<sup>17,19,20,21)</sup>。嚥下活動と呼吸活動の調整が、脳幹の橋に存在する Kölliker - Fuse 核で行われているとする報告もある<sup>22,23,24,25)</sup>。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<sup>4,7,10)</sup>。また、過去の研究では、興奮性伝達を担う神経伝達物質に関してはある程度明らかになってきているものの<sup>5,17,18,26)</sup>、主要な抑制性伝達を担う神経伝達物質受容体については知られていない。

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<sup>27-30)</sup>。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、新生仔ラット延髄 *en bloc* 標本や若年ラット *in situ* 標本では温存されている修飾機構を除外した条件下で、嚥下活動を発現し得る最小の延髄スライス標本を作成した。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試みた。

## 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-22-016-0)と動物の愛護および管理に関する法律を順守して行った。

### 延髓スライス標本の作成

実験には、46 匹の生後 2 日齢 Sprague-Dawley (SD) 系ラットを用いた。イソフルラン(和光純薬工業)を用いて十分に麻酔を行った後、最尾側肋骨下で下半身を切断し、前頭縫合で前頭部分を切除した直後に、4°Cに冷却し 95 %O<sub>2</sub>・5 %CO<sub>2</sub> 混合ガス(大協物産)で飽和させた人工脳脊髄液内に浸透した。その後、頭蓋骨を除去し、四丘体上丘より吻側で大脳を除去した。続いて標本の背側より脊椎骨を除去し脊髄を剖出した。脳幹は、小脳を除去した後、その直下に存在する菱形窩正中溝、顔面神経丘、第四脳室髄条を明示した。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。脳幹組織表面に残存する硬膜を除去した後に、脳幹ブロックを一塊にして摘出した。脳幹腹側は、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、脳幹ブロックの腹側表面から左右それぞれ吻尾側方向に 6 本程度出現するが、それらの内最も吻側に出現する左右 1 対の神経束のみ残した。続いて、摘出した脳幹ブロックをマイクロスライス用チャンバーにピン固定した。マイクロスライス作成装置 (LINEARSLICER PRO7、堂阪イ

一エム)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 100 $\mu\text{m}$  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 600-800 $\mu\text{m}$  の 100 $\mu\text{m}$  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(図 1)。

### 神経活動の記録

記録用チャンバー(RC-26GLP、Warner Instruments)をステージ固定式正立顕微鏡(Axio Examiner D1、Carl Zeiss)のステージ上に設置し、室温下(23~25°C)で人工脳脊髄灌流液を 3ml/min の速度で灌流した。延髄スライス標本を記録用チャンバーに静置し、スライスアンカー(SHD-42/10、Warner Instruments)にて固定した。神経活動の記録は、先端径が 0.15-0.2mm に調節された人工脳脊髄灌流液で満たしたグラスピペット(200EA/PKG、外径 1.2mm×内径 0.68mm、A-M Systems)をサクションエレクトロード(Suction Electrode、A-M Systems)に固定したグラス吸引電極を用いて、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。記録したシグナルは、アンプリファイア(DAM50、World Precision Instruments)にて  $10^4$  倍に増幅し(High-cut filter 10kHz、Low-cut filter 300Hz)、AD コンバーター(Powerlab 4/26、AD Instruments)を通し、コンピューター(LM-iG310X3、Windows8、mouse computer)と専用ソフトウェア(Labchart7、AD Instruments)を用いて記録し解析を行った。

延髄スライス標本を作成する際は、人工脳脊髄液の組成を 124 NaCl、25 NaHCO<sub>3</sub>、3.0 KCl、1.5 CaCl<sub>2</sub>、1.0 MgSO<sub>4</sub>、0.5 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、11 glucose (mM) (和光純薬工業)とし、神経活動の記

録の際は、呼吸活動の発現を記録するために KCl の濃度を 8.0mM とした人工脳脊髄灌流液を使用した<sup>31)</sup>。

### 嚥下活動の誘発

嚥下活動を誘発するために以下の 2 つの方法を用いた。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と、延髄スライス標本内の NTS ～ GABA<sub>A</sub> 受容体拮抗薬である Bicuculline ((-) -Bicuculline methiodide ; BIC、フナコシ) を局所微量投与する方法である。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。

迷走神経への電気刺激：先端径を 0.2-0.3mm に調節し、人工脳脊髄液で満たしたグラスピペット(200EA/PKG、外径 1.2mm×内径 0.68mm、A-M Systems)をサクションエレクトロード(Suction Electrode、A-M Systems)に固定したグラス吸引電極を用いて、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。刺激にはエレクトリカルステイミュレーター(Electronic Stimulator、Nihon Kohden)を用いた。電気刺激強度は 5.0V、刺激時間 1ms、刺激頻度は 50Hz とし、一部の実験では単発刺激(刺激強度 5.0V、刺激時間 1ms、3-5 回刺激)とした。

片側 NTS への BIC の局所微量投与：マイクロマニュピレータ(NMN-21、NARISHIGE)に固定した薬剤微量投与用シリンジ(IM-9B、NARISHIGE)先端に、先端径を 0.05-0.1mm に調節したグラスピペット(GC100-10 #30-0016、外径 1.0mm×内径 0.58mm、Harvard Apparatus)を保持し行った。グラスピペットには、Dimethylsulfoxide (DMSO、和光純薬工業株式会社)に溶

解した BIC を酸素化した人工脳脊髄液に混和した溶液を満たした。Bicuculline の目的投与量は 0.2-1.0pmol とした。この目的投与量を得るために、グラススピペット内の BIC 濃度は 0.01mM とし、投与量は 0.2-1μl 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 の深さまでグラススピペット先端を挿入した位置で行った。

#### 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(和光純薬工業)にて固定し、正立顕微鏡(Leica DM2000、Leica)で観察した。

#### 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 受容体拮抗薬である CNQX (6-Cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione ; CNQX、abcam) または、NMDA 受容体拮抗薬である D-AP5 (D-(-)-2-Amino-5-phosphonopentanoic acid ; AP5、abcam) を、10μM 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。嚥下活動の誘発は迷走神経の電気刺激によって行った。薬剤投与後の評価は、薬剤投与後少なくとも 10 分以上経過した後に行った。薬剤投与前後の検討項目は、呼吸活動および嚥下活動の神経活動時間の変化、神経活動の最大振幅の変化、嚥下活動発現頻度の変化、呼吸間隔の変化とした。

## 統計処理

データは平均±標準偏差の形で表示した。二群間の有意差検定は Student's *t*-test を用い、

有意水準は 5%とした。

## 結果

### 延髄スライス標本からの嚥下活動の誘発

図 1 に示すように、延髄側面から出現した左右の迷走神経知覚枝の吻側端を結ぶレベルから吻側へ 100 $\mu\text{m}$  の位置を吻側切断面と設定し、そこから尾側へ 600 $\mu\text{m}$  (図 1 点線①、n=10)、700 $\mu\text{m}$  (図 1 点線②、n=10) または 800 $\mu\text{m}$  (図 1 点線③、n=26) の厚さで作成したスライス標本の舌下神経より記録された神経活動を図 2 に示す (600 $\mu\text{m}$ ; 図 2A、700 $\mu\text{m}$ ; 図 2B、800 $\mu\text{m}$ ; 図 2C および D)。600 $\mu\text{m}$  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 (図 2A)。700 $\mu\text{m}$  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 (図 2B)。しかし、迷走神経への電気刺激によって神経活動を誘発することはできなかった。800 $\mu\text{m}$  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 (図 2C) ことに加え、迷走神経への電気刺激によって (図 2D) 呼吸活動 (図 2b) とは異なる波形を示す神経活動が誘発された (図 2a)。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 (図 3)、活動時間は迷走神経刺激反応性の活動において有意に大きかった (図 3B) が、最大振幅に有意差は認めなかつた (図 3C)。さらに活動パターンの特徴として、活動時間に対する最大振幅に到達するまでの時間の割合 (図 3D) を比較すると、呼吸活動が 16.9±6.9% であったのに対して迷走神経刺激反応性活動は 51.1±4.3% と、統計学的有意差を認めた。これは、呼吸活動は漸減型活動パ

ターン(rapidly peaking-slowly decrementing pattern)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(slowly peaking-slowly decrementing pattern)の特徴を持つことを示す結果であった。これまで当研究室において新生仔ラット延髄 *en bloc* 標本および若年ラット *in situ* 標本から迷走神経へ電気刺激を行うことによって誘発された活動が嚥下活動であることを確認してきたが、今回の研究における延髄スライス標本から誘発された神経活動の活動パターンは *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<sup>27-30)</sup>。

次に、迷走神経への電気刺激によって舌下神経から誘発された神経活動が嚥下活動であることを確認する目的で、厚さ 800 $\mu\text{m}$  の延髄スライス標本に対し、片側 NTS への BIC の局所微量投与を行った。片側 NTS に対する BIC の局所微量投与によって嚥下活動が誘発されることは、過去に報告がなされている<sup>30,32)</sup>。図 4C に BIC 局所微量投与後に舌下神経から記録された神経活動を示す。この神経活動と呼吸活動を比較すると(図 5)、活動時間(図 5A)および最大振幅(図 5B)は統計学的な有意差は認めなかった一方で、活動時間に対する最大振幅までの時間の割合(図 5C)は、呼吸活動が  $13.2 \pm 2.6\%$  であったのに対して誘発性の神経活動は  $55.8 \pm 8.0\%$  と、誘発性神経活動が有意に大きかった。これは、BIC の局所微量投与により誘発された神経活動が、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(slowly peaking-slowly decrementing pattern)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<sup>27,29,30)</sup>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

本研究にて得られた延髄スライス標本表面の顕微鏡写真を図6に示す。2日齢のSDラットを用いた場合、吻側切断面から尾側へ800μmの位置はArea Postrema(AP)にほぼ一致した<sup>33-35)</sup>。スライス標本の切断面を観察した結果、図6に示すような神経核が観察された。これらの切断面は、図1Bで示した矢状面シェーマにおける切断面と一致した。

#### 嚥下活動による呼吸活動の活動間隔の延長

厚さ800μmの延髄スライス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(図7A、B)。安静時の呼吸活動の活動間隔と、嚥下活動が発現した時の呼吸活動の活動間隔を比較すると、嚥下活動の誘発を迷走神経への電気刺激で行った場合(図7A)、またはNTSに対するBIC局所微量投与を用いた場合(図7B)、いずれも嚥下活動が発現した時の呼吸活動の活動間隔の有意な延長を認めた。

#### 薬剤投与による嚥下活動の変化

延髄スライス標本において、嚥下活動を発現するための主要な興奮性神経伝達物質の受

容体を検討する目的で、non-NMDA 受容体の拮抗薬である CNQX および NMDA 受容体の拮抗薬である AP5 の投与前後における、迷走神経への電気刺激で誘発した嚥下活動の変化を検討した。

800 $\mu$ m の厚さの延髓スライス標本へ CNQX (10 $\mu$ M) を投与することにより<sup>18,36,37)</sup>、自発的な呼吸活動(図 8A)が消失した(図 8B)。延髓スライス標本から得られた自発的な呼吸活動が CNQX によって完全に抑制されることは良く知られている<sup>36,37)</sup>。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(図 8C)、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(図 8D、n=6)。CNQX 投与前後での嚥下活動の変化を比較すると(図 9)、活動時間(図 9A)、最大振幅(図 9B)、刺激に対する嚥下活動の発現率(図 9C)いずれも CNQX の投与によって有意に減少したが、嚥下活動の発現は残存した。

AP5 (10 $\mu$ M) の投与によって<sup>18,26)</sup>、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(図 10)。嚥下活動の変化を比較すると(図 11)、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(図 11A、B)。一方で、AP5 投与後は嚥下活動の発現が完全に抑制された(図 11C)。さらに、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(図 10A および図 11D)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(図

10B および図 11E)。

## 考察

本研究により、安定した嚥下活動を誘発し得る延髄スライス標本を作成することに成功した。

この延髄スライス標本は、生後 2 日目の SD ラットでは厚さが 800 $\mu$ m であり、この中に嚥下活動を誘発するための求心性回路、嚥下活動を形成するためのパターン形成回路、出力のための遠心性回路が最小限に温存されていると考えられた。さらに、本スライス標本に NMDA 受容体の拮抗薬を投与することによって、自発的な呼吸活動と刺激誘発性の嚥下活動を分離できることが明らかとなり、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が NMDA 受容体であることが示唆された。

スライス標本から誘発された嚥下性活動について

本研究では延髄スライス標本から嚥下活動を誘発するために、迷走神経に対する電気刺激を用いた。迷走神経電気刺激にて誘発性に嚥下活動が安定して再現できることは、種々の動物を対象にした過去の研究にて確認されており<sup>6-8,12-14,18,38-40)</sup>、嚥下活動を選択的に誘発させるために最も信頼性が高い方法と言える。当研究室においても迷走神経に対する電気刺激が、新生仔ラット延髄 en bloc 標本および若年ラット in situ 標本から安定した嚥下活動を誘発し得ることを報告してきた<sup>27-30)</sup>。本研究において、迷走神経に対する電気刺激の強度は、これらの当研究室における過去の実験と同様の強度であった。また、嚥下活動を示す神経活動パターンの特徴は、en bloc 標本および in situ 標本のいずれの実験系においても、ピークが中央

に位置する漸増-漸減パターンであるが、本研究において延髄スライス標本から迷走神経に対する電気刺激にて誘発させた神経活動は、同様の活動パターンを示した。さらに、当研究室では過去に新生仔ラット *en bloc* 標本の NTS へ GABA<sub>A</sub> 受容体拮抗薬である BIC を局所微量投与することによって、嚥下活動を安定して誘発することができることを報告していた<sup>30)</sup>ため、今回の研究においても延髄スライス標本の NTS に対する BIC の局所微量投与を試みた。その結果、複数のピークを持ち比較的長い活動時間を見せる神経活動が記録されたが、これは同じ方法で新生仔ラット *en bloc* 標本から誘発した嚥下活動の特徴と一致するものであった<sup>30,32)</sup>。迷走神経を電気刺激した場合と NTS に対する BIC の局所微量投与の場合で、誘発される神経活動パターンが変化したが、これは定常状態において嚥下活動をトリガーする神経細胞は NTS 周辺の外側網様体から GABA<sub>A</sub> 受容体を介する抑制入力を受けていたと考えられており<sup>21,32)</sup>、NTS に対して BIC の局所微量投与を行うとこの抑制入力が遮断されるため、数回程度の連続した嚥下活動が出現し易くなるためであると考えられた<sup>30,41)</sup>。延髄スライス標本では、これまでの *en bloc* 標本および *in situ* 標本で行ったように、口腔から食道までの上部消化管を保存した標本を作成することによって誘発した活動が嚥下活動か否かを機能的に確認することはできなかったものの、本研究で誘発された神経活動と *en bloc* 標本および *in situ* 標本で誘発された嚥下活動との上記のような類似性から、本研究で誘発された神経活動は嚥下活動であると考えられた。

## 嚥下活動を再現し得る最小の延髄スライス標本について

本研究において、嚥下活動を誘発し得る最小の延髄スライス標本を作成するために、まず延髄側面から迷走神経が出現するレベルを起点に吻側へ 100 $\mu\text{m}$  の高さを吻側切断面と設定した。これは、迷走神経からの求心性回路を機能的に温存するためである。これ以上切断面を迷走神経に近接させると、安定した嚥下活動の誘発を得ることができなかつた。生後 2 日目の SD ラットを用いた場合、この吻側切断面から尾側へ 800 $\mu\text{m}$  の厚さのスライス標本を抽出すると、尾側の切断面はほぼ AP(第四脳室の尾側端)と一致した。すなわち、本スライス標本内には AP より吻側の NTS、呼吸中枢(pre-Bötzinger 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。本標本に温存された舌下神経から神経活動の記録を行うと、安静時には周期性の自発的呼吸活動を認めた。呼吸活動を発現するための最小の延髄スライス標本は、新生仔ラットを用いて 350-400 $\mu\text{m}$  の厚さで作成できることはよく知られており<sup>31,42-46)</sup>、呼吸中枢の神経ネットワークの解明に非常に大きな役割を果たしている<sup>31,42-45,47)</sup>。この呼吸中枢、舌下神経運動核、および舌下神経を含んだ延髄スライス標本から記録される呼吸活動は、漸減型を示し、活動時間は 200-400ms で、活動インターバルはおよそ 7-10s (0.1-0.15 回/s) である<sup>31,43-45)</sup>。本研究で用いた延髄スライス標本は呼吸活動の最小ネットワークをその中に含むため、安静時に自発的な呼吸活動を発現したが、その呼吸活動の活動パターン、活動時間、活動周期は呼吸活動の最小スライス標本から記録されるものと同様であった。本研究で作成したスライス標本(厚み 800 $\mu\text{m}$ )は、呼吸活動の最小スライス標本と比較すると

尾側に 100-150 $\mu\text{m}$ 、吻側に約 200 $\mu\text{m}$  厚く、吻側では顔面神経核の尾側端、尾側では疑核の尾側端を含む。これらの吻尾側へ厚みを増した延髄組織の中に、安静時の呼吸活動に大きな影響をおよぼす神経機構は含まれていないことが推察された。本研究において、吻側切断面から尾側へ 600 $\mu\text{m}$  の厚さで作成したスライス標本では、自発性の呼吸活動が認められなかつたが、これは吻側切断面から 600 $\mu\text{m}$  の厚みでは呼吸中枢の尾側の一部が障害されたためであると推測された。吻側切断面から尾側へ 700 $\mu\text{m}$  の厚みを設定したスライス標本では、迷走神経に対する電気刺激によって嚥下性活動は誘発されなかったのに対して、厚さを 800 $\mu\text{m}$  に設定することで、嚥下活動を誘発することができた。以上の結果から、厚さ 800 $\mu\text{m}$  のスライスの尾側切断面すなわち延髄背側では AP の高さから吻側へ 100 $\mu\text{m}$  の組織の中に、迷走神経への電気刺激によって嚥下活動を誘発するために必須の最小回路が含まれている可能性が考えられた。NTS にはいくつかの亜核が存在することが知られている<sup>38,40,48-57)</sup>。迷走神経に対する電気刺激は、NTS の亜核である intermediate subnuclei (NTSim) と interstitial subnuclei (NTSis) へ伝達される<sup>38,48,50)</sup>。これらの亜核は直接または ventral subnuclei (NTSv) を介して舌下神経運動核へ接続していることが報告されており<sup>38,48,50,52,57)</sup>、口腔期および咽頭期の嚥下活動は、これらの亜核と ventral subnuclei (NTSv) において形成されている可能性がある<sup>54)</sup>。Area Postrema 付近のレベルにおける NTsim、NTSis および NTSv から嚥下活動と関連したタイミングで発火する神経細胞の記録が多くなされていることから<sup>40,52,57)</sup>、AP 周辺における NTS 亜核に嚥下 CPG が存在する可能性が示されてきたが、今回の研究結果より、ventrolateral

subnuclei を含んだ<sup>38,40,48-50)</sup>AP より尾側の NTS は嚥下活動の発現に必須では無い可能性が考えられた。さらに今回の研究結果は、AP から吻側へ 100 $\mu$ m の間に、嚥下活動を発現するために必須となる神経回路が存在する可能性を示唆するものであった。しかしながら、この AP から吻側へ 100 $\mu$ m の組織中に存在し、嚥下活動の発現に必須と考えられた神経回路が、迷走神経から NTS に投射する求心性回路なのか、嚥下活動のパターン形成回路なのか、あるいは舌下神経運動核への投射回路であるのかは今回の研究では明らかでなく、今後の検討が必要であると考えられる。

#### 嚥下性活動による呼吸活動の抑制

本研究では、迷走神経電気刺激および NTS への BIC 局所微量投与のどちらの実験でも、嚥下活動の発現によって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<sup>58-61)</sup>としてよく知られている。実験的にも同様の現象はよく報告されており、当研究室でも過去に新生仔ラット延髄 en bloc 標本から誘発した嚥下活動による一過性の呼吸活動の抑制に注目し、それが延髄内の  $\alpha$ 2 アドレナリン受容体によって修飾を受けることを報告した<sup>27)</sup>。嚥下活動による一過性の呼吸活動の抑制は、誤嚥を防止するために非常に重要な生理機能であると考えられるが、その中枢神経機構についての知見は多くない。近年、Bonis らは麻酔下ヒツジの橋に存在する Kölliker-Fuse 核に対し、グルタミン酸受容体作動薬であるイボテン酸を局所投与することにより嚥下活動の

発現と呼吸活動抑制の消失が認められることを報告し<sup>22,25,62)</sup>、この神経核が swallowing apnea の発現に主要な役割を果たすと結論した。これ以外には、直接のエビデンスは示されていないものの、嚥下 CPG と呼吸 CPG の直接的な連繋によって swallowing apnea が発現されるという仮説の提唱もある<sup>37,63-65)</sup>。今回の研究において、呼吸活動の活動間隔の延長は、迷走神経への電気刺激および NTS に対する BIC の局所微量投与いずれの方法で嚥下活動を誘発した場合でも、安静時の呼吸活動間隔と比較して約 70-80%の延長を認めた。過去に当研究室が *en bloc* 標本を用いて報告した嚥下活動発現による呼吸活動の活動間隔延長は 82.3±22.5% であり<sup>27)</sup>、本研究における呼吸活動間隔の延長と同程度であった。すなわち今回の研究結果は、嚥下活動を発現する最小のスライス標本においても、延髓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、このことから swallowing apnea は、本研究で用いた 800 $\mu$ m の延髓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。この嚥下活動による呼吸活動の抑制は、嚥下活動によるものではなく、迷走神経への電気刺激による可能性も考えられる。実際、全身麻酔下ラットの迷走神経への電気刺激によって嚥下活動の発現なしに呼吸活動の活動パターンが影響を受けるとする報告もある<sup>13,30)</sup>。しかしながら、これらの研究では電気刺激の強度が非常に強いこと、さらに本研究において AP5 の投与によって嚥下活動の発現をブロックした上で迷走神経に電気刺激を加えても、呼吸活動の抑制は認めなかったことから、本研究における呼吸活動間隔の変化は嚥下活動の発現によるものであると考えられた。

## 薬剤投与による神経活動の変化について

本研究では、CNQX の投与では、迷走神経刺激による嚥下活動の誘発が残存した一方で、AP5 を投与することで嚥下活動の発現がブロックされた。一方自発的な呼吸活動は AP5 の投与によって影響を受けなかったのに対し、CNQX によってその発現がブロックされた。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、嚥下活動の誘発には NMDA 受容体が必須であることを示唆する結果であった。呼吸活動を発現する最小延髄システム標本内では呼吸中枢 (pre-Bötzinger complex)<sup>31)</sup> 内のシナプス接合および呼吸中枢から舌下神経運動核へのシグナル伝達のいずれにおいても、主要な興奮性神経伝達は non-NMDA 受容体を介して行われることはよく知られており<sup>18)</sup>、本研究における呼吸活動についての結果は過去の研究結果と一致するものであった。嚥下活動について、この必須と考えられた NMDA 受容体が、嚥下活動をトリガーする求心性回路に関わるものか、嚥下活動の形成回路に関わるものか、あるいは形成された嚥下活動を舌下神経運動核に伝える遠心性回路に関わるものは不明である。NTS には NMDA 受容体および non-NMDA 受容体の両方が存在し、血圧調節や嘔吐反射の形成に関わることが知られている<sup>18,55,56,66,67)</sup>。嚥下活動について、Kessler らの報告<sup>18)</sup>によって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 $\mu$ m に位置する NTSim、NTSis および NTSv 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。また本研究において、CNQX 投与後に、誘発される嚥下活動の活動時間の短縮や活動の大きさの減少を認めたが、嚥下活動が all or none の特徴を持つことを鑑みると、これは嚥下活動が形成された後、舌下神経運動核へシグナル伝達される際に、CNQX によって一部の出力回路が遮断された結果であることが推察された。

## 結語

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 $\mu$ 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。

## 謝辞

本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、御指導頂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、御協力を頂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 EN, Brennen C, Wagener M, Muder RR.(2016): Pneumonia in long-term care: a prospective case-control study of risk factors and impact on survival. *Arch Intern Med.* 161:2378-81
- 2) 厚生労働省. (2016) : 平成 27 年 (2015) 人口動態統計の年間推計.  
<http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/geppo/nengai15/dl/gaikyou27.pdf>
- 3) 海老原覚, 大国生幸, 宮城翠, 伊豆藏英明. (2016) : 呼吸機能障害のリハビリテーション. *The Japanese Journal of Rehabilitation Medicine* 53(11):829-33
- 4) Umezaki T, Matsuse T, Shin T.(1998): Medullary swallowing-related neurons in the anesthetized cat. *Neuroreport.* 9(8):1793-8
- 5) Katakura N, Jia L, Nakamura Y.(1995): NMDA-induced rhythmical activity in XII nerve of isolated CNS from newborn rats. *Neuroreport.* 6(4):601-4
- 6) Kessler JP, Jean A.(1985): Identification of the medullary swallowing regions in the rat. *Exp Brain Res.* 57(2):256-63
- 7) Kobashi M, Mizutani S, Fujita M, Mitoh Y, Shimatani Y, Matsuo R.(2014): Central orexin inhibits reflex swallowing elicited by the superior laryngeal nerve via caudal brainstem in the rat. *Physiol Behav.* 130:6-12.
- 8) Luker J, Scully C.(1990): The lateral medullary syndrome. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 69(3):322-4
- 9) Martino R, Terrault N, Ezerzer F, Mikulis D, Diamant NE.(2001): Dysphagia in a patient with lateral medullary syndrome: insight into the central control of swallowing. *Gastroenterology.* 121(2):420-6
- 10) Amirali A, Tsai G, Schrader N, Weisz D, Sanders I.(2001): Mapping of brain stem neuronal circuitry active during swallowing. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 110(6):502-13

- 11) Ezure K, Oku Y, Tanaka I.(1993): Location and axonal projection of one type of swallowing interneurons in cat medulla. *Brain Res.* 632(1-2):216-24
- 12) Shiba K, Nakazawa K, Ono K, Umezaki T.(2007): Multifunctional laryngeal premotor neurons: their activities during breathing, coughing, sneezing, and swallowing. *J Neurosci.* 27(19):5156-62
- 13) Jean A.(2001): Brain stem control of swallowing: neuronal network and cellular mechanisms. *Physiol Rev.* 81(2):929-69
- 14) Amri M, Car A, Roman C.(1990): Axonal branching of medullary swallowing neurons projecting on the trigeminal and hypoglossal motor nuclei: demonstration by electrophysiological and fluorescent double labeling techniques. *Exp Brain Res.* 81(2):384-90
- 15) Bellingham MC, Lipski J.(1992): Morphology and electrophysiology of superior laryngeal nerve afferents and postsynaptic neurons in the medulla oblongata of the cat. *Neuroscience.* 48(1):205-16
- 16) Bautista TG, Fong AY, Dutschmann M.(2014): Spontaneous swallowing occurs during autoresuscitation in the in situ brainstem preparation of rat. *Respir Physiol Neurobiol.* 202:35-43
- 17) Bieger D.(1991): Neuropharmacologic correlates of deglutition: lessons from fictive swallowing. *Dysphagia.* 6(3):147-64
- 18) Kessler JP, Jean A.(1991): Evidence that activation of N-methyl-D-aspartate (NMDA) and non-NMDA receptors within the nucleus tractus solitarius triggers swallowing. *Eur J Pharmacol.* 201(1):59-67
- 19) 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(4):395-404

- 20) Holstege G, Graveland G, Bijker-Biemond C, Schuddeboom I.(1983): Location of motoneurons innervating soft palate, pharynx and upper esophagus. Anatomical evidence for a possible swallowing center in the pontine reticular formation. An HRP and autoradiographical tracing study. *Brain Behav Evol.* 23(1-2):47-62
- 21) Johnson JW, Ascher P.(1987): Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature.* 325(6104):529-31
- 22) Bonis JM, Neumueller SE, Krause KL, Kiner T, Smith A, Marshall BD, Qian B, Pan LG, Forster HV.(2010): Site-specific effects on respiratory rhythm and pattern of ibotenic acid injections in the pontine respiratory group of goats. *J Appl Physiol* 109(1):171-88
- 23) Bautista TG, Dutschmann M.(2014): Ponto-medullary nuclei involved in the generation of sequential pharyngeal swallowing and concomitant protective laryngeal adduction in situ. *J Physiol.* 592(12):2605-23
- 24) Stettner GM, Huppke P, Brendel C, Richter DW, Gärtner J, Dutschmann M.(2007): Breathing dysfunctions associated with impaired control of postinspiratory activity in Mecp2-/y knockout mice. *J Physiol.* 579(Pt 3):863-76
- 25) Bonis JM, Neumueller SE, Krause KL, Pan LG, Hodges MR, Forster HV.(2013): Contributions of the Kölliker-Fuse nucleus to coordination of breathing and swallowing. *Respir Physiol Neurobiol.* 189(1):10-21
- 26) Steenland HW, Liu H, Sood S, Liu X, Horner RL.(2006): Respiratory activation of the genioglossus muscle involves both non-NMDA and NMDA glutamate receptors at the hypoglossal motor nucleus in vivo. *Neuroscience.* 138(4):1407-24
- 27) Yamanishi T, Takao K, Koizumi H, Ishihama K, Nohara K, Komaki M, Enomoto A, Yokota Y, Kogo M.(2010): Alpha2-adrenoceptors coordinate swallowing and respiration. *J Dent Res.* 89(3):258-63
- 28) 青海哲也. (2013) : ラット working heart-brainstem preparation を用いた嚥下運動の解析. 2013 年 3 月学位論文

- 29) Yamanishi T, Koizumi H, Komaki M, Ishihama K, Adachi T, Enomoto A, Takao K, Iida S, Kogo M.(2008): Possible involvement of neurons in locus coeruleus in inhibitory effect on glossopharyngeal expiratory activity in a neonatal rat brainstem-spinal cord preparation in vitro. *Neurosci Res.* 60(1):2-9
- 30) 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
- 31) Smith JC, Ellenberger HH, Ballanyi K, Richter DW, Feldman JL.(1991): Pre-Bötzinger complex: a brainstem region that may generate respiratory rhythm in mammals. *Science.* 254(5032):726-9
- 32) Cinelli E, Iovino L, Bongianni F, Pantaleo T, Mutolo D.(2016): GABA<sub>A</sub>- and glycine-mediated inhibitory modulation of the cough reflex in the caudal nucleus tractus solitarii of the rabbit. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 311(3):L570-80
- 33) Joseph A, Shirley AB.(1995): Atlas of prenatal rat brain development. CRC Press. 582-89
- 34) Swanson LW.(2004): Brain Maps III-Structure of the Rat Brain. ELSEVIER Academic Press. 60-68
- 35) Barraco R, el-Ridi M, Ergene E, Parizon M, Bradley D.(1992): An atlas of the rat subpostremal nucleus tractus solitarius. *Brain Res Bull.* 29(6):703-65
- 36) Bissonnette JM, Hohimer AR, Knopp SJ.(1997): Non-NMDA receptors modulate respiratory drive in fetal sheep. *J Physiol.* 501 ( Pt 2):415-23
- 37) Funk GD, Smith JC, Feldman JL.(1995): Modulation of neural network activity in vitro by cyclothiazide, a drug that blocks desensitization of AMPA receptors. *J Neurosci.* 15(5 Pt 2):4046-56
- 38) Kalia M, Mesulam MM.(1980): Brain stem projections of sensory and motor components of the vagus complex in the cat: I. The cervical vagus and nodose ganglion. *J Comp Neurol.* 193(2):435-65

- 39) Saito Y, Ezure K, Tanaka I.(2002): Difference between hypoglossal and phrenic activities during lung inflation and swallowing in the rat. *J Physiol.* 544(Pt 1):183-93
- 40) Sang Q, Goyal RK.(2001): Swallowing reflex and brain stem neurons activated by superior laryngeal nerve stimulation in the mouse. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 280(2):G191-200
- 41) Wasserman AM, Ferreira M Jr, Sahibzada N, Hernandez YM, Gillis RA.(2002): GABA-mediated neurotransmission in the ventrolateral NTS plays a role in respiratory regulation in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 283(6):R1423-41
- 42) Sherman D, Worrell JW, Cui Y, Feldman JL.(2015): Optogenetic perturbation of preBötzinger complex inhibitory neurons modulates respiratory pattern. *Nat Neurosci.* 18(3):408-14
- 43) Sakuma H, Katakura N, Shimozato K, Hiraba K.(2013): Effects of medullary lesions on conditional pacemaker activity of neonatal rat hypoglossal motoneurons in vitro. *Neurosci Res.* 76(1-2):42-51
- 44) Koizumi H, Koshiya N, Chia JX, Cao F, Nugent J, Zhang R, Smith JC.(2013): Structural-functional properties of identified excitatory and inhibitory interneurons within pre-Bötzinger complex respiratory microcircuits. *J Neurosci.* 33(7):2994-3009
- 45) Koizumi H, Ishihama K, Nomura K, Yamanishi T, Kogo M, Matsuya T.(2002): Differential discharge patterns of rhythmical activity in trigeminal motoneurons during fictive mastication and respiration in vitro. *Brain Res Bull.* 58(1):129-33
- 46) Greer JJ, al-Zubaidy Z, Carter JE.(1996): Thyrotropin-releasing hormone stimulates perinatal rat respiration in vitro. *Am J Physiol.* 271(5 Pt 2):R1160-4
- 47) Jones SE, Stanić D, Dutschmann M.(2016): Dorsal and ventral aspects of the most caudal medullary reticular formation have differential roles in modulation and formation of the respiratory motor pattern in rat. *Brain Struct Funct.* 221(9):4353-4368

- 48) Kalia M, Mesulam MM.(1980): Brain stem projections of sensory and motor components of the vagus complex in the cat: II. Laryngeal, tracheobronchial, pulmonary, cardiac, and gastrointestinal branches. *J Comp Neurol.* 193(2):467-508
- 49) Broussard DL, Altschuler SM.(2000): Central integration of swallow and airway-protective reflexes. *Am J Med.* 108 Suppl 4a:62S-67S
- 50) Broussard DL, Altschuler SM.(2000): Brainstem viscerotopic organization of afferents and efferents involved in the control of swallowing. *Am J Med.* 108 Suppl 4a:79S-86S
- 51) Wang YT, Bieger D.(1991): Role of solitarii GABAergic mechanisms in control of swallowing. *Am J Physiol.* 261(3 Pt 2):R639-46
- 52) Sugiyama Y, Shiba K, Nakazawa K, Suzuki T, Umezaki T, Ezure K, Abo N, Yoshihara T, Hisa Y.(2011): Axonal projections of medullary swallowing neurons in guinea pigs. *J Comp Neurol.* 519(11):2193-211
- 53) Whitehead MC.(1988): Neuronal architecture of the nucleus of the solitary tract in the hamster. *J Comp Neurol.* 276(4):547-72
- 54) Corson J, Aldridge A, Wilmoth K, Erisir A.(2012): A survey of oral cavity afferents to the rat nucleus tractus solitarii. *J Comp Neurol.* 520(3):495-527
- 55) Furukawa N, Hatano M, Fukuda H, Koga T.(1998): Non-N-methyl-D-aspartate receptors may mediate the transmission of emetic signals between visceral vagal afferents and the solitary nucleus in dogs. *Neurosci Lett.* 258(1):53-6
- 56) Koga T, Fukuda H.(1992): Neurons in the nucleus of the solitary tract mediating inputs from emetic vagal afferents and the area postrema to the pattern generator for the emetic act in dogs. *Neurosci Res.* 14(3):166-79
- 57) Winfried N, Detlef B.(2012): Brainstem Control of Deglutition: Brainstem Neural Circuits and Mediators Regulating Swallowing. Chapter In: *Principles of Deglutition* 89-113
- 58) Broussard DL, Altschuler SM.(2000): Brainstem viscerotopic organization of afferents and efferents involved in the control of swallowing. *Am J Med.* 108 Suppl 4a:79S-86S

- 59) Hiss SG, Strauss M, Treole K, Stuart A, Boutilier S.(2004): Effects of age, gender, bolus volume, bolus viscosity, and gustation on swallowing apnea onset relative to lingual bolus propulsion onset in normal adults. *J Speech Lang Hear Res.* 47(3):572-83
- 60) Butler SG, Stuart A, Pressman H, Poage G, Roche WJ.(2007): Preliminary investigation of swallowing apnea duration and swallow/respiratory phase relationships in individuals with cerebral vascular accident. *Dysphagia.* 22(3):215-24
- 61) Hårdemark Cedborg AI, Bodén K, Witt Hedström H, Kyulenstierna R, Ekberg O, Eriksson LI, Sundman E.(2010): Breathing and swallowing in normal man-effects of changes in body position, bolus types, and respiratory drive. *Neurogastroenterol Motil.* 22(11):1201-8
- 62) Bonis JM, Neumueller SE, Marshall BD, Krause KL, Qian B, Pan LG, Hodges MR, Forster HV.(2011): The effects of lesions in the dorsolateral pons on the coordination of swallowing and breathing in awake goats. *Respir Physiol Neurobiol.* 175(2):272-82
- 63) Gestreau C, Milano S, Bianchi AL, Grélot L.(1996): Activity of dorsal respiratory group inspiratory neurons during laryngeal-induced fictive coughing and swallowing in decerebrate cats. *Exp Brain Res.* 108(2):247-56
- 64) Bautista TG, Sun QJ, Pilowsky PM.(2014): The generation of pharyngeal phase of swallow and its coordination with breathing: interaction between the swallow and respiratory central pattern generators. *Prog Brain Res.* 212:253-75
- 65) Dick TE, Oku Y, Romanik JR, Cherniack NS.(1993): Interaction between central pattern generators for breathing and swallowing in the cat. *J Physiol.* 465:715-30
- 66) Sartor DM, Verberne AJ.(2007): The role of NMDA and non-NMDA receptors in the NTS in mediating three distinct sympathoinhibitory reflexes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 376(4):241-52
- 67) Zhao H, Peters JH, Zhu M, Page SJ, Ritter RC, Appleyard SM.(2015): Frequency-dependent facilitation of synaptic throughput via postsynaptic NMDA receptors in the nucleus of the solitary tract. *J Physiol.* 593(1):111-25

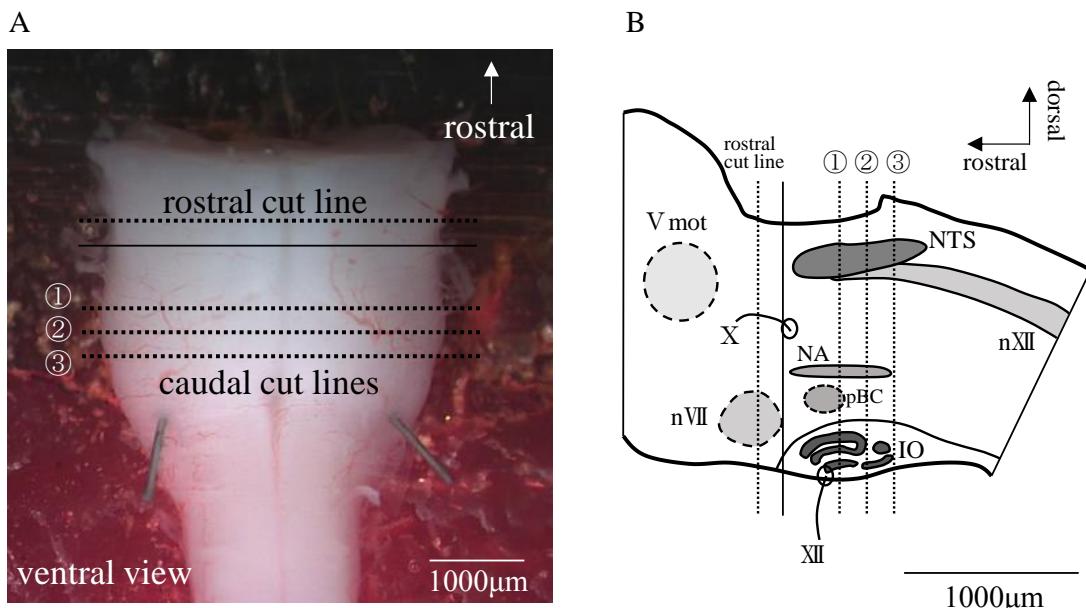


図1 延髓スライス標本の作成

Aは2日齢SDラットより摘出した脳幹-脊髄標本の腹側面観を示す。BはAに対応する脳幹-脊髄標本の矢状断の模式図を示す。A、Bの中の実線は、両側の迷走神経束(知覚神経)の吻側端を結ぶレベルを示す。実線から100μm吻側を吻側切断面(rostral cut line)と設定し点線で示した。点線①、②、③はそれぞれ吻側切断面から尾側へ600μm、700μm、800μmの位置であり、これらを尾側の切断面(caudal cut lines)として3種類の厚みの延髓スライス標本を作製した。1個体から1枚の延髓スライス標本を作製し実験を行った。

V mot: 三叉神経運動核 nVII: 顔面神経核 nXII: 舌下神経運動核 X: 迷走神経 XII: 舌下神経 NA: 疑核 pBC: pre-Bötzinger complex IO: オリーブ核 NTS: 孤束核

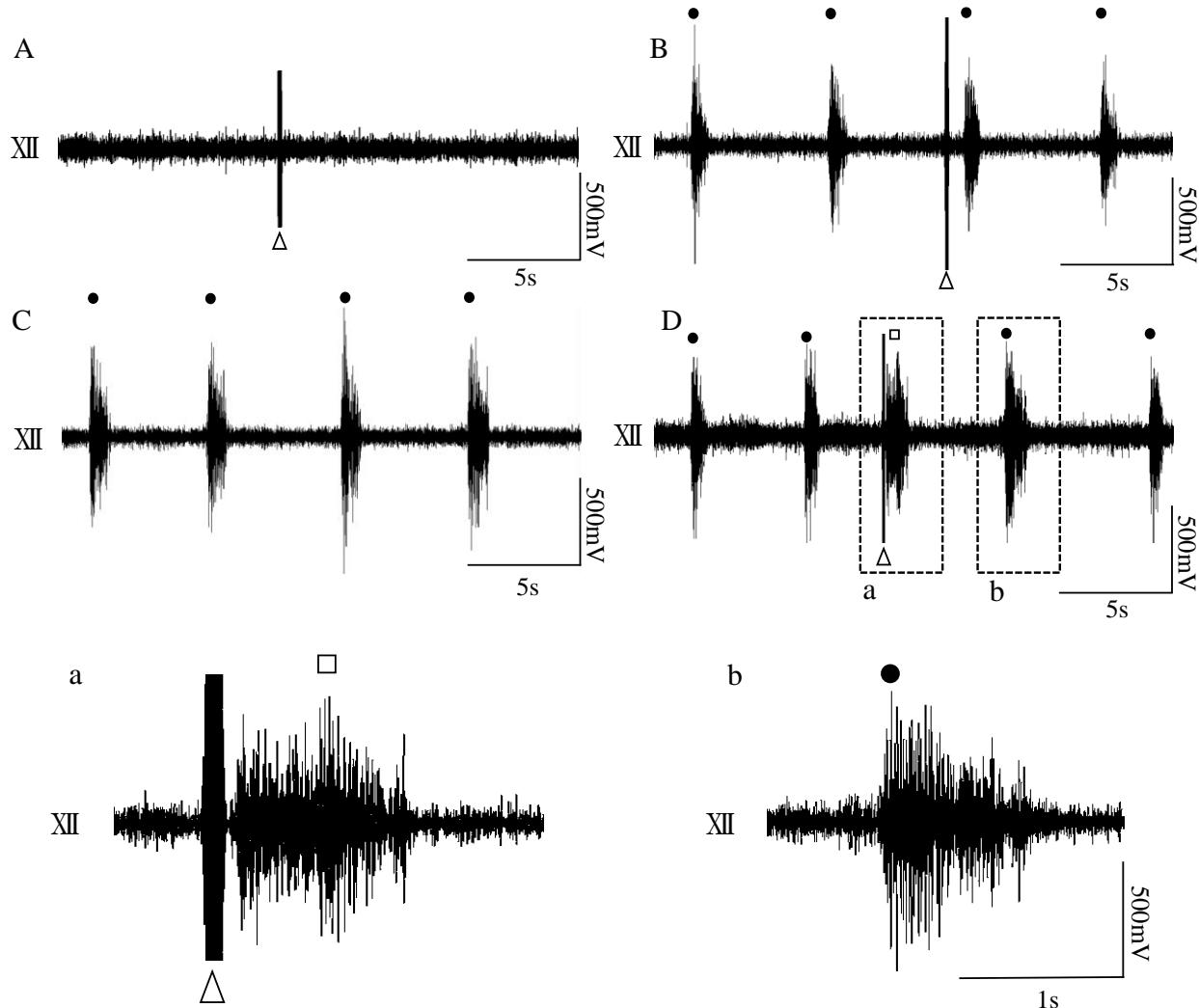


図2 延髓スライス標本から記録された神経活動

吻側の切断面から厚さを600μm(A)、700μm(B)および800μm(C、D)に設定した延髓スライス標本の舌下神経から記録した神経活動を示す。厚さ600μmのスライス標本の舌下神経からは安静時、迷走神経への電気刺激時共に神経活動は認めなかつた(A)。厚さ700μmのスライス標本では、周期性の呼吸活動が記録された(B)。厚さ800μmのスライス標本において、安静時の周期性の呼吸活動に加えて(C)、迷走神経へ電気刺激誘発性の神経活動(D)を認めた。a、bはD中の拡大図を示す。図中白抜き三角は電気刺激、黒丸は呼吸活動を、白抜き四角は迷走神経刺激誘発性の神経活動を示す。

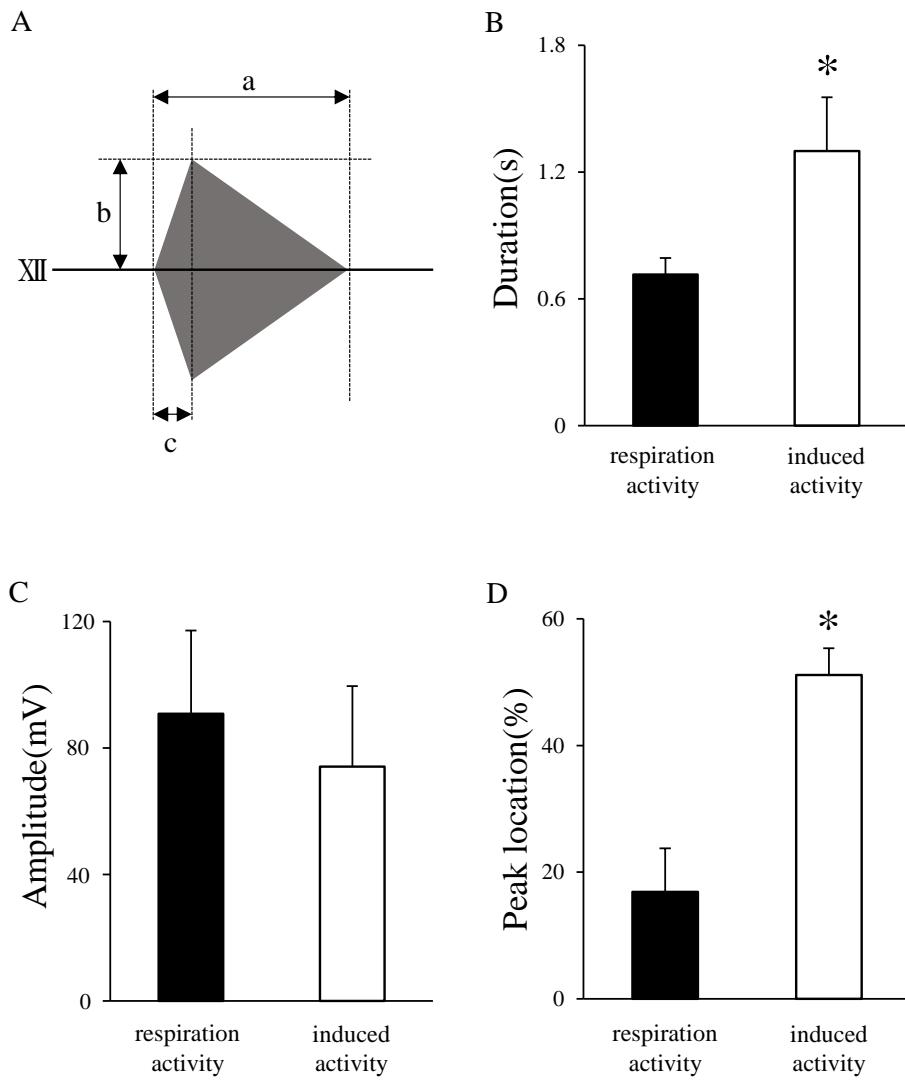


図3 呼吸活動と迷走神経刺激反応性の神経活動の比較

800 $\mu$ m厚さの延髄スライス標本の舌下神経から記録した呼吸活動と迷走神経電気刺激反応性の神経活動を比較した(n=13)。Aは測定項目を示す。aを活動時間(Duration) (B)、bを最大振幅(Amplitude) (C)、c/a×100を活動時間に対する最大振幅までの時間の割合(Peak location) (D)として検討を行った。活動時間は迷走神経刺激反応性の活動が有意に長かった(B)。最大振幅は有意差は認めなかった(C)。活動時間に対する最大振幅までの時間の割合は迷走神経刺激反応性活動が有意に大きかった(D)。\* p < 0.05

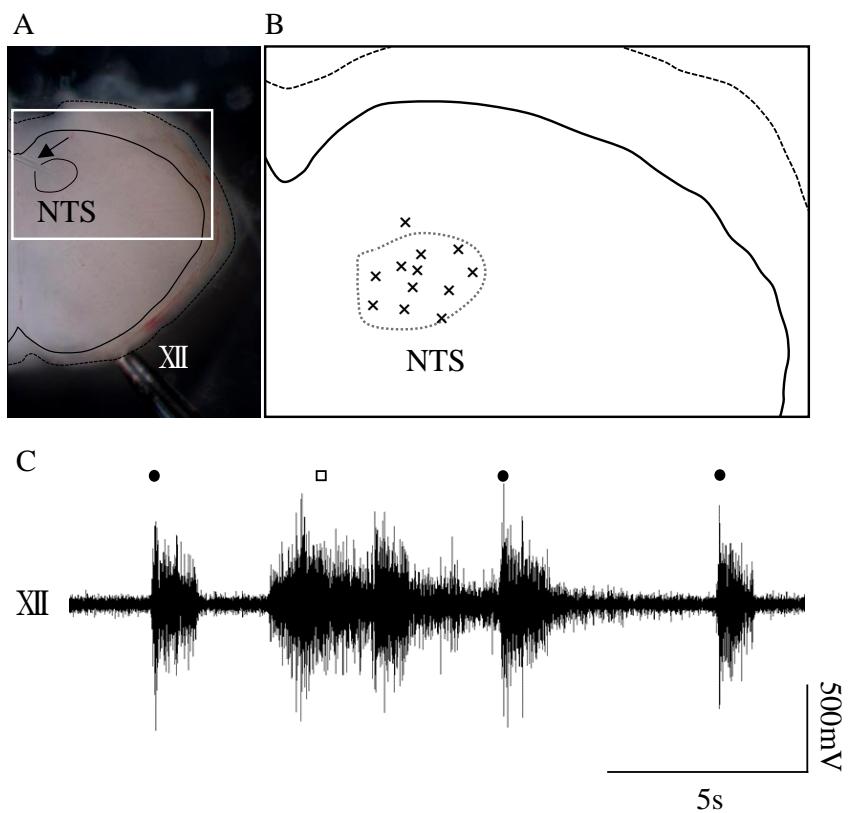


図4 片側NTSへのBIC局所微量投与法により誘発された神経活動

Aは、800μm厚さの延髄スライス標本に対して片側NTSへBICの局所微量投与を行っている写真を示す。スライス標本は尾側が上側になるように記録チャンバーに静置し、標本表面を観察しながら局所微量投与用のグラスピペットを投与位置へ誘導した。図中実線はスライス標本の尾側面の輪郭、点線は吻側面(下側)の輪郭を示す。A中の矢印で示すグラスピペットの先端がNTS領域内の延髄組織に挿入されている。BはA内白線の拡大図である。局所微量投与した箇所を十字で表した(n=12)。CにBICの局所微量投与後に舌下神経から記録された神経活動を示す。黒丸は呼吸活動を示す。白抜き四角に自発的な呼吸活動とは活動パターンの異なる薬剤投与誘発性の神経活動を示す。

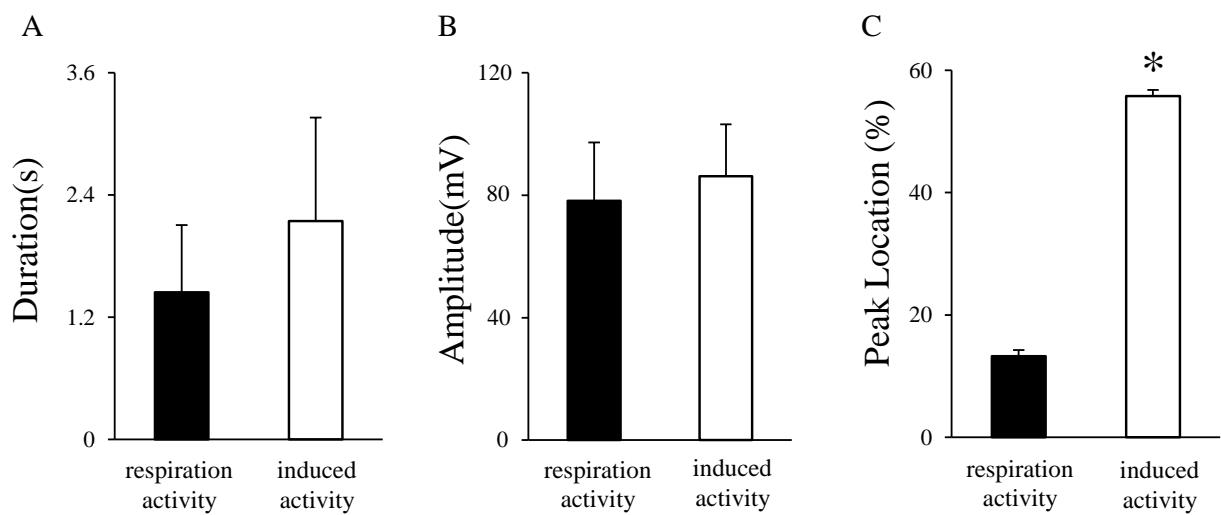


図5 BIC局所微量投与により誘発された神経活動と呼吸活動の比較

呼吸活動とNTSへのBIC局所微量投与により誘発された神経活動の比較を示す(n=12)。活動時間(A)および最大振幅(B)は有意差を認めなかった。活動時間に対する最大振幅までの時間の割合(C)は、薬剤誘発性の神経活動が有意に大きかった。\*p < 0.05

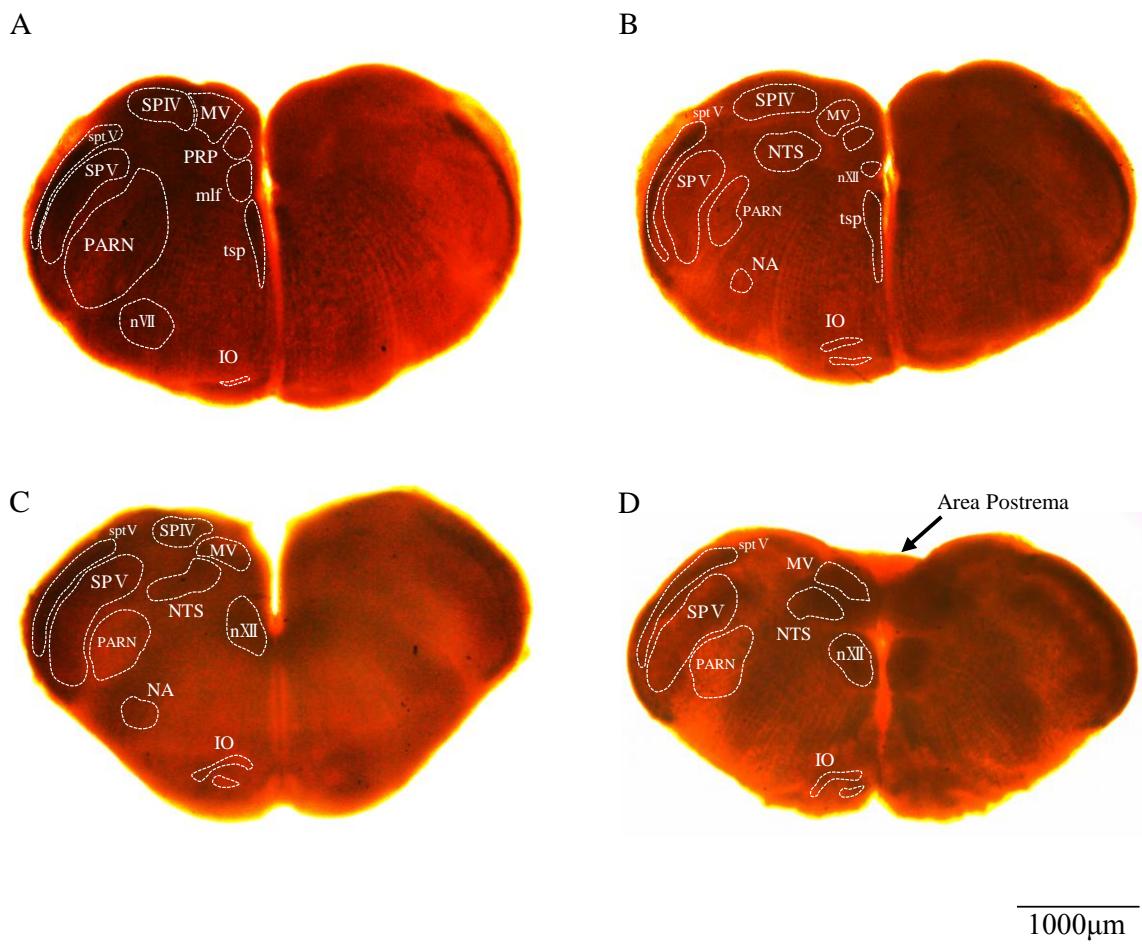


図6 延髄スライス標本の解剖

延髄スライス標本の顕微鏡写真を示す。Aは吻側切断面を示す。Bは厚さ600μmのスライスの尾側切断面、Cは厚さ700μmのスライスの尾側切断面、Dは厚さ800μmのスライスの尾側切断面を示す。

IO:オリーブ核 mlf:内側縦束 MV:前庭神経内側核 NA:疑核 nVII:顔面神経核 NTS:孤束核 nXII:舌下神経核 PARN:小細胞性網様核 PRP:前位核 SPIV:前庭神経核 SPV:三叉神経脊髄路核 sptV:三叉神経脊髄路 tsp:視蓋脊髄路

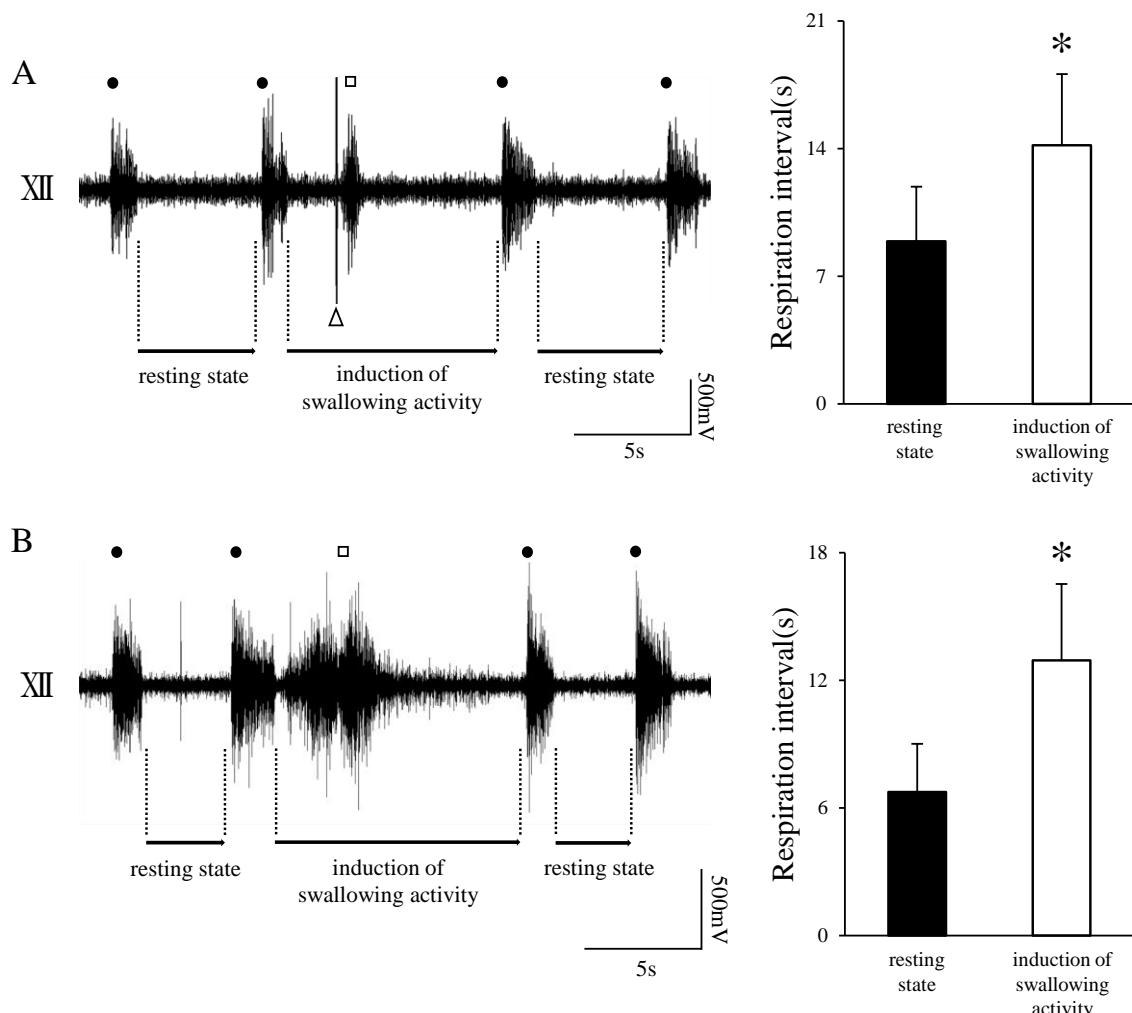


図7 噫下活動の発現による呼吸活動の活動間隔の延長

嚙下活動を誘発した時の呼吸活動の活動間隔 (induction of swallowing activity) をその前後で嚙下活動が発現していない時(安静時)の呼吸活動間隔 (resting state)と比較した。Aは迷走神経への電気刺激にて誘発した嚙下活動を、BはNTSへのBIC局所微量投与にて誘発した嚙下活動を示す。嚙下活動を誘発したときの呼吸活動の活動間隔は安静時の呼吸活動の活動間隔と比較して、迷走神経への電気刺激の場合は 59.6% (n=10) の延長を、BIC局所投与の場合は 92.5% (n=10) の延長を認めた。いずれの変化も統計学的有意差を認めた。\*p < 0.05

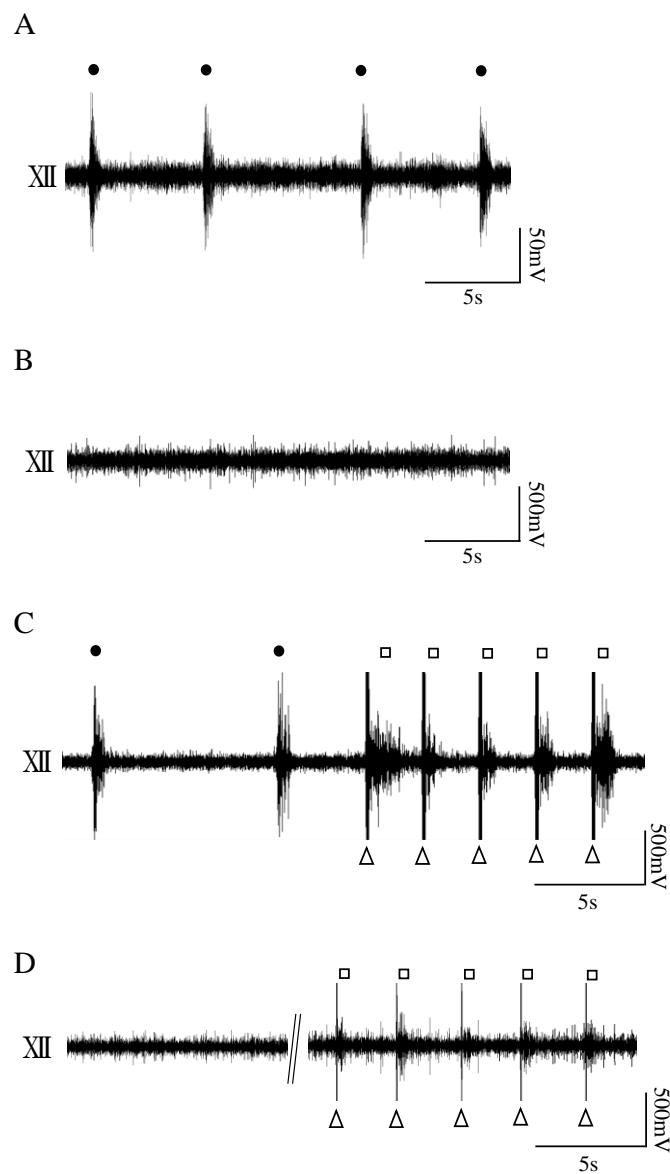


図8 CNQX投与による神経活動の変化

CNQXの投与前後の神経活動の変化を示す(n=6)。AおよびCはCNQX投与前、BおよびDは投与後の神経活動の記録を示す。CNQXの投与によって投与前に認めていた自発的な呼吸活動(A)が消失した(B)。一方CNQX投与前に誘発された嚥下活動(C)は、CNQX投与後も発現を認めた(D)。

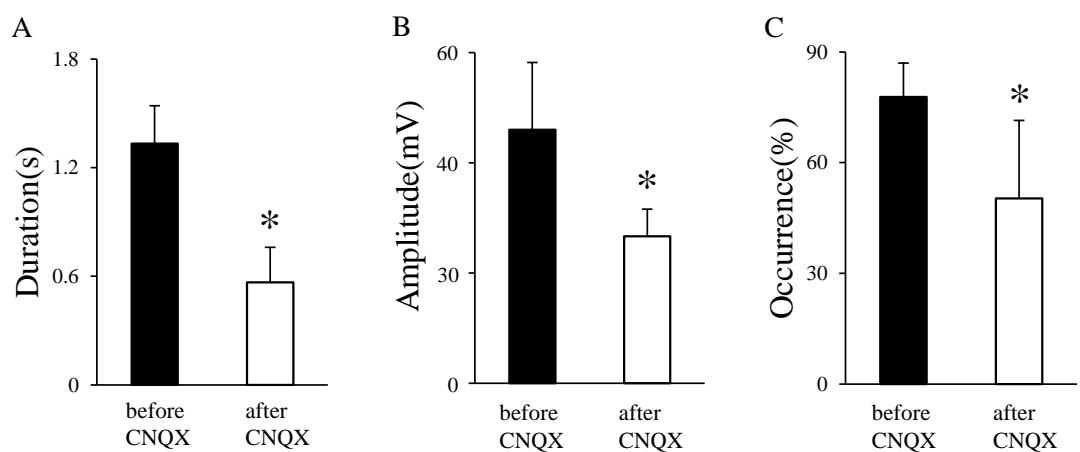


図9 CNQX投与前後の嚥下活動の比較

CNQX投与前後の、迷走神経への電気刺激によって誘発された嚥下活動の変化を示す(n=6)。活動時間(A)、最大振幅(B)および迷走神経刺激により誘発される嚥下活動の発生頻度(C)のすべての項目で、CNQX投与後に有意に減少を認めたが、嚥下活動の発現は残存した。 \*p < 0.05

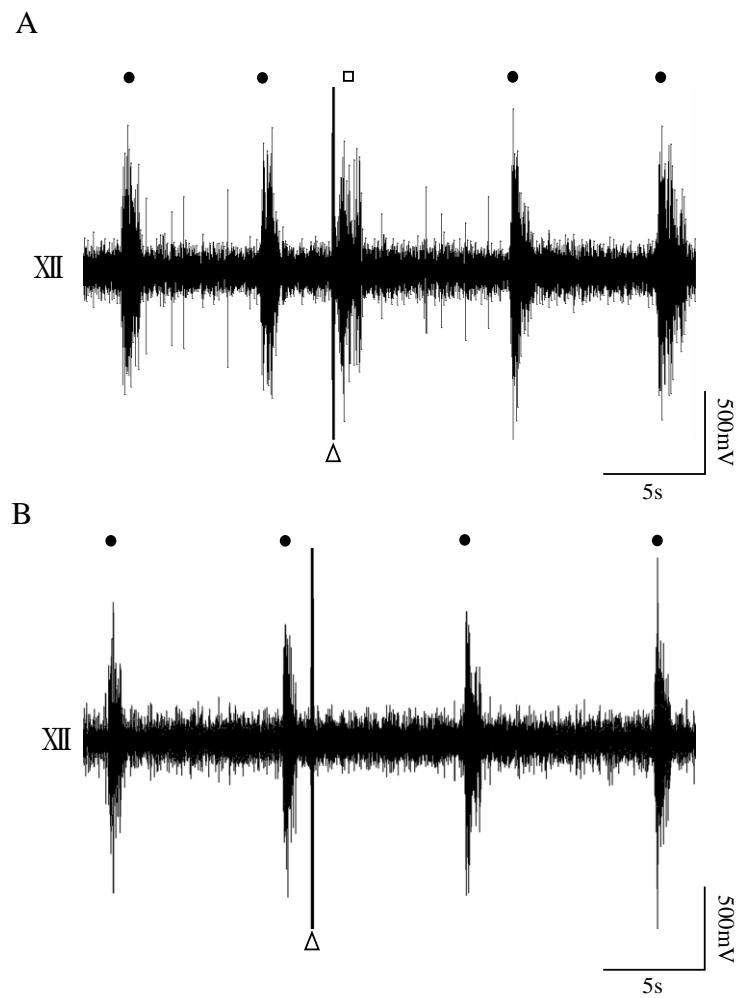


図10 AP5投与による神経活動の変化

AP5の投与前後における神経活動の変化を示す( $n=5$ )。AP5投与前では、迷走神経への電気刺激により嚥下活動の誘発を認めた(A)に対して、AP5投与後は嚥下活動の発現が消失した(B)。呼吸活動に大きな変化は認めなかった。AP5投与によって嚥下活動の発現がブロックされると(B)嚥下活動の発現による呼吸間隔の延長作用が消失した。

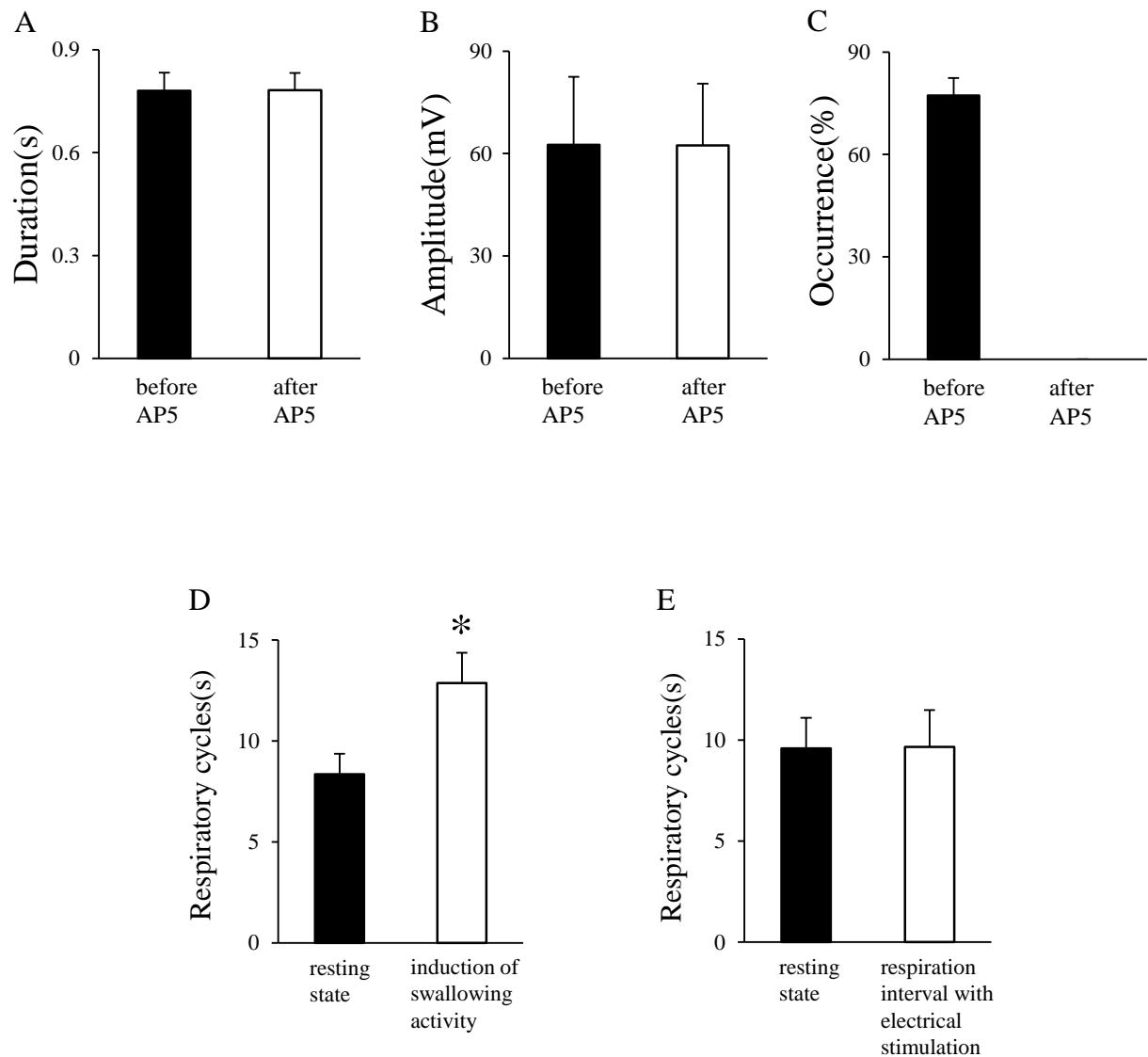


図11 AP5投与前後の神経活動の比較

AP5投与前後の、呼吸活動および迷走神経への電気刺激で誘発した嚥下活動の変化を示す(n=5)。呼吸活動はAP5投与前後で有意差を認めなかった(A、B)。一方、嚥下活動はAP5投与の投与後に発現が完全にブロックされた。またAP5投与前に認めた嚥下活動発現時の呼吸活動の有意な延長は(D)、AP5の投与によって嚥下活動がブロックされると消失した(E)。 \*p < 0.05