

## 論文の内容の要旨

氏名：北 大 樹

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：嚥下痛に関与する延髄および上部頸髄ニューロンの同定

様々な原因で舌や軟口蓋などに炎症や組織損傷が引き起こされると、嚥下を初めとする口腔の運動機能が障害され、栄養摂取に対して大きな障害がもたらされる。特に、軟口蓋部の痛みは嚥下反射を強く抑制し、嚥下機能を著しく障害すると報告され、軟口蓋の痛みと嚥下運動の機能連関のメカニズムに関する研究が進められている。舌や顎の運動、あるいは嚥下において重要な中枢領域は三叉神経運動核および延髄の孤束核(NTS)や疑核であることが明らかにされている。これらの諸核に存在するニューロンは運動出力を直接コントロールすると同時に、口腔顔面領域から侵害情報や非侵害情報を受けて運動機能調節に関与していると考えられている。一方で、口腔や顔面領域からの侵害情報は三叉神経脊髄路核尾側亜核(Vc)およびC1やC2などの上部頸髄に投射し、これらの領域に存在するニューロンに侵害情報を伝えている。これまでの報告によると、口腔内の侵害情報を受けるニューロンはVcおよびC1-C2領域において、両側性に分布しており、また顔面からの侵害情報を受けるニューロンに比べて広い領域に分布すると報告されている。一方、嚥下の機能調節に対して重要と考えられている軟口蓋部からの侵害情報に関しては、全く報告がなされておらず、軟口蓋の痛みがどのようなメカニズム嚥下反射調節に関与するかについては全く明らかにされていない。そこで、本研究では軟口蓋部の侵害情報が嚥下反射調節に対してどのようなメカニズムで関与するかを明らかにすることを最終目的とし、VcおよびC1-C2領域に分布するニューロンが軟口蓋の侵害情報を受けるかどうか、もし軟口蓋の侵害情報を受けるニューロンが存在するのであれば、どのような分布様式を持っているかを明らかにすることを計画した。

最近の研究で、侵害刺激によって活動するニューロンを視覚化する手段の一つとして、マップキナーゼファミリーの一つとして知られている extracellular signal-regulated kinase (ERK) のリン酸化を組織学的に検出する方法が開発された。口腔顔面領域の侵害刺激によってVcおよびC1-C2に分布するニューロンにおいてERKのリン酸化が誘導され、このリン酸化は刺激後数分以内にスタートすることが報告されている。また、抗リン酸化ERK(pERK)抗体に対して陽性を示す細胞(pERK-IR細胞)数は刺激強度依存的に増加することが明らかにされている。このような結果から、pERK-IR細胞は侵害入力を受けて興奮したニューロンである可能性が高いとされ、侵害受容ニューロンの興奮性マーカーとして用いることができるといわれている。そこで、本研究では、軟口蓋部の侵害刺激によって発現するpERK-IR細胞の延髄および上部頸髄における分布様式を明らかにし、軟口蓋の侵害処理機構の一端を解明することを目的とした。

実験にはSprague-Dawley系雄性ラットを用いた。ラットをペントバルビタールNa(50 mg/kg, i.p.)で麻酔し、ウォームマットの上に仰臥位で寝かせ、バイトブロックを用いて開口した状態にし、左側軟口蓋部粘膜下に10 mM カプサイシン溶液(5・1)を静かに注入した。また、vehicleとしてカプサイシンの溶媒(100%エタノール, 7% Tween 80 および生理食塩液の混合液)を同量、左側軟口蓋部粘膜下に注入し、コントロールとした。カプサイシン注入5分後、ラットをペントバルビタールNa(80 mg/kg, i.p.)にて深く麻酔し、生理食塩液にて脱血後、0.1 M phosphate bufferにて希釈した500 ml 4% paraformaldehyde溶液(pH 7.4)を用いて灌流固定を行った。灌流固定終了後に延髄と上部頸髄を含む全脳を摘出し、同様の固定液で4°C 2日間、後固定を行った。マイクロトームにて三叉神経脊髄路核を含む延髄および上部頸髄の連続切片標本(厚さ30  $\mu$ m)を作製し、4切片毎に1切片を取り出し、一次抗体としてrabbit anti phosphor-p44/42 MAP kinase antibody(1:1000)を用いて免疫組織化学的染色を施し、DAB法にて発色した。pERK-IR細胞数のカウントはDAB反応させた切片を光学顕微鏡下で観察し、Neuro-Lucida(Micro Bright Field)を用いて行った。

ラット軟口蓋部粘膜下にカプサイシン投与し、侵害刺激を与えることによって延髄およびC1-C2に発現するpERK-IR細胞の分布様式を詳細に検討した。軟口蓋粘膜下にカプサイシンを微量投与し5分経過したラットの延髄において、Vc, NTS, 傍三叉神経核(Pa5)および延髄網様核(RF)に多くのpERK-IR細胞発現を認めた。いずれの核においても、発現したpERK-IR細胞は両側性の分布を示していた。pERK-IR細胞は

細胞質および核、共に黒色に染色され、樹状突起様の線維も多く観察された。Vc, NTS および Pa5 においては、非常に多くの pERK-IR 細胞が密に分布しているのに対し、RF においては少数の pERK-IR 細胞が検出されたのみであった。また、Vc においては細胞体が疎な部位に多くの黒色に濃染した線維が多く観察され、これらは網目状に Vc 表層部に分布していた。それぞれの核内における pERK-IR 細胞の分布様式をみると、Vc においては背側部に限局していたが、他の NTS, Pa5 および RF においては明らかな分布の偏りは認められなかった。また、左右における分布密度をみると、どの核においても明確な左右差を見出すことができなかった。

Vc, NTS, Pa5 および RF から検出された pERK-IR 細胞は、Vc と NTS がほぼ同数、Pa5 と RF がほぼ同数であった。カプサイシン注入によって vehicle 注入群よりも有意に多くの pERK-IR 細胞数が検出されたのは、Vc のみであった。NTS においては vehicle 投与群に比べ、やや多くの pERK-IR 細胞発現を認めたが細胞数に有意差は認められなかった。

カプサイシン投与群および vehicle 投与群のどちらも、pERK-IR 細胞は obex および obex から 3000・m 尾側(-3000・m)の部位にピークを示す 2 峰性の分布を示していた。また、その分布範囲は obex から約 3000・m 吻側、7500・m 尾側部の範囲に広がっていた。これまでの研究に従うと、pERK-IR 細胞数が最も多く発現した obex 付近は Vc 領域と三叉神経脊髄路核中間亜核と尾側亜核移行部領域である Vi/Vc に相当する。さらに、ほとんどの高さにおいて、カプサイシン投与群の方が vehicle 投与群よりも多くの pERK-IR 細胞発現を認めた。

口腔顔面領域の侵害情報は主に刺激を受けた側と同側の Vc および C1-C2 領域に分布する侵害受容ニューロンに送られ、情報処理がなされることが明らかにされている。顔面部皮膚から侵害情報を受けるニューロンは Vc および C1-C2 領域において、体部位局在性がはっきりしているのに対し、口腔内から侵害情報を受けるニューロンは局在性が認められず、体部位局在性がはっきりしないといわれている。本研究においては、軟口蓋部の刺激によってリン酸化された pERK-IR 細胞は Vc および C1-C2 領域において両側性の差は認められないものの、背側部に偏った分布を示していた。侵害受容ニューロンの分布様式の違いは口腔顔面領域の侵害情報処理において、侵害刺激を受けた場所の違いを反映しているといわれている。これまでの報告および著者の研究結果から考察すると、軟口蓋の侵害情報を受ける Vc および C1-C2 の侵害受容ニューロンは痛みの左右差の弁別能は低いと考えられる。

また、軟口蓋へのカプサイシン注射によって発現した pERK-IR 細胞は Vc および C1-C2 の背側部に分布していた。これまでの研究からこの領域には歯髄や舌の侵害刺激によって pERK-IR 細胞が発現する領域と一致していることから、軟口蓋の侵害情報を受ける侵害受容ニューロンのあるものは歯髄や舌からの侵害情報を受ける可能性が高い。このようなことから、この領域に存在する侵害受容ニューロンは軟口蓋、舌あるいは歯髄からの侵害情報処理を同時に行っていることが予想される。

さらに、pERK-IR 細胞が発現している Vc および C1-C2 における層をみると、殆どの細胞は表層に限局している。これまでの多くの研究により、Vc および C1-C2 の表層には口腔顔面領域の侵害情報を受ける広作動域 (WDR) ニューロンおよび特異的侵害受容 (NS) ニューロンが多数分布する部位として知られている。おそらく、本研究で検出された pERK-IR 細胞の多くが WDR あるいは NS ニューロンに分類されると考えられる。WDR ニューロンは侵害刺激および非侵害刺激の両方の入力を受けているのに対し、NS ニューロンは侵害入力のみを受けると報告されている。また、WDR ニューロンは刺激強度の符号化において重要な働きを有するといわれている。このような報告から考察を加えると、軟口蓋から侵害入力を受ける Vc および C1-C2 ニューロンは軟口蓋の痛みの符号化において重要な働きを有する可能性があるといえる。

これまでの研究により、NTS は嚥下誘発において重要な働きを有する中継核であり、この領域に入力した口腔内からの感覚情報によって嚥下反射が引き起こされる。また、内臓からの侵害情報を受けて自律神経系調節に関与するともいわれ、複数の機能を有する核として知られている。本研究では非常に多くの pERK-IR 細胞発現を検出したが、これらのニューロンは内臓の侵害感覚と同様、軟口蓋からの侵害入力を受けて自律神経系応答を調節しているものと思われる。しかしながら、本研究では vehicle 刺激によっても多くの pERK-IR 細胞発現を認めたことから、ペントバルビタール Na の腹腔内投与による内臓からの感覚入力の様な、軟口蓋以外の侵害刺激によって発現した可能性もある。

Pa5 には顔面皮膚から侵害入力を受ける侵害受容ニューロンが多数存在しており、これらの侵害受容ニューロン活動は迷走神経刺激で有意に抑制され、一方で交感神経刺激によって有意に亢進するといわれている。このような結果から、著者がこの領域から検出した pERK-IR 細胞は軟口蓋の侵害情報だけでなく、自律神経系からの情報を受けている可能性がある。また、Pa5 ニューロンは NTS に投射し、この領域のニュー

ロン活動を変調すると報告されている。以上から、おそらく軟口蓋のカプサイシン刺激によって Pa5 に発現する pERK-IR 細胞は NTS の活動調節に関与している可能性が考えられる。

RF に関しては NTS と同様、自律神経系応答調節に関与するという報告があるが 26)、その他の機能に関してはほとんど研究がなされていない。そのため、軟口蓋刺激によってこの領域に発現した pERK-IR 細胞がどのような機能に関与しているかについては分からない。

Tsujimura らの研究により、舌の侵害刺激により、多くの pERK-IR 細胞が NTS, Pa5 および Vc に発現し、同時に嚥下反射は有意に抑制され、さらに NTS および Pa5 を破壊すると嚥下反射の抑制が有意に回復したことが明らかにされている。これらの結果は、口腔内の侵害情報が NTS あるいは Pa5 を介して嚥下反射を抑制していることを意味している。おそらく、本研究において NTS および Pa5 で検出された pERK-IR 細胞もこれらの核を介して嚥下反射調節に関与している可能性がある。

以上の結果から、軟口蓋の侵害入力を受ける Vc の侵害受容ニューロンは口腔内の痛みを、NTS および Pa5 の侵害受容ニューロンは軟口蓋の侵害情報処理と嚥下反射調節の両方に関与する可能性が示された。