

# 嚥下痛に關与する延髓および上部頸髓ニューロンの同定

日本大学大学院歯学研究科歯学専攻

北 大樹

(指導：岩田 幸一 教授，篠田 雅路 准教授)

## 緒言

摂食から嚥下に至る一連の機能が正常に働くためには、舌や軟口蓋を含む口腔からの感覚情報が重要な働きを有することが報告され、口腔の感覚と運動出力である咀嚼嚥下との機能連関の重要性が報告されるようになってきた<sup>1-3)</sup>。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、嚥下を初めとする様々な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をもたらされる<sup>4,5)</sup>。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に関する研究が進められている<sup>6,7)</sup>。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<sup>8-10)</sup>。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<sup>6,9)</sup>。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<sup>11,12)</sup>。これまでの報告によると、口腔内の侵害情報を受けるVcおよびC1-C2領域に存在するニューロンは、顔面の侵害受容ニューロンに比べると、両側性で広い領域に分布すると

報告されている<sup>12)</sup>。一方、嚙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で嚙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嚙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、その第一歩として1) 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、2) 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方法の一つとして、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)** のリン酸を組織学的に検出する方法が開発された<sup>13)</sup>。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<sup>12)</sup>。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<sup>14)</sup>。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

一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した。

## 材料および方法

本研究において、実験動物の取扱いは日本大学歯学部実験動物委員会の指針および、国際疼痛学会の基準に従って行われた<sup>15)</sup>。実験には Sprague-Dawley 系雄性ラット 10 匹を用いた。

### 1. カプサイシンの投与方法

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  $\mu$ l) を静かに注入した (第 1 図の矢印で示した部位)。カプサイシン (和光) は 100% エタノール と 7% Tween 80 で溶解したものを生理的食塩液で希釈し 10 mM とした。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、このラットをコントロールとした。カプサイシン注入 5 分後、ラットにペントバルビタール Na (80 mg/kg, i.p.) を注射して深く麻酔し、500 ml 生理食塩液にて脱血後、0.1 M phosphate buffer にて希釈した 4% paraformaldehyde 溶液 (pH 7.4) 500 ml 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部位を摘出し、同様の固定液で4℃  
2日間、後固定を行った。

## 2. 抗 pERK 抗体による免疫染色方法

取り出した脳脊髄標本を 0.01 M phosphate buffered saline (PBS) にて希釈した  
20% スクロース溶液 (w/v) に移し換え、2日間、4℃に保存した。

一昼夜4℃で保存された標本をドライアイスで凍結し、マイクロトーム (ERMA)  
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 μm)  
を作製し、以下の方法に従って4切片毎に1切片を取り出し、免疫組織化学的  
染色を施した。まず、切片を 0.3% Triton X 100/ 3% NGS-PBS に 1.5~2 時間浸漬  
し、ブロッキングを行った。その後、4℃で一次抗体 rabbit anti phosphor-p44/ 42  
MAP kinase (ERK 1/ 2) antibody (1: 300 ; Cell Signaling Technology) に 3 日間浸漬  
した。その後、0.01 M PBS 溶液で5分間の洗浄を3回行い、以下の方法によっ  
て 3,3'-diaminobenzidine tetra hydrochloride (DAB, 東京化成) 染色を施した。ま  
ず、厚さ 30 μm の切片を、1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を 60μl 加えた 0.01M PBS (pH 7.2) 200 ml に  
30 分間浸漬し、内因性ペルオキシダーゼを不活性化した後、0.01 M PBS にて 5  
分間の洗浄を5回行った。洗浄終了後、0.3% Triton X 100/ 3% NGS-PBS に 1.5  
~2 時間浸漬し、ブロッキングを行った。その後、4℃で一次抗体 rabbit anti

phosphor-p44/42 MAP kinase antibody (1: 1000) に 3 日間浸漬し, 0.01 M PBS にて 5 分間の洗浄を 3 回行った。次いで切片を二次抗体 anti-IgG (H+L), Rabbit, Goat-Poly, Biotin (1: 600 ; Vector laboratories) に室温で 2 時間浸漬した。その後 ABC kit (Vector laboratories) を用いて室温で 1 時間, 酵素抗体反応を行った。0.01 M PBS による 10 分間の洗浄を 3 回繰り返した後, さらに 0.05 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) で 10 分間洗浄し, DAB, 0.2% nickel ammonium sulfate および 0.009% peroxide in 0.05 M Tris Buffer (pH 7.4) に反応させた。その後切片を 0.01 M PBS にて洗浄し, ゼラチンコーティングしたスライドガラスに貼り付け, 室温にて乾燥させた後, アルコールとキシレンにより脱脂を行い, EUKITT (O. Kindler) を用いて封入した。また, 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。

### 3. 統計学的解析

データは平均  $\pm$  標準誤差で表し, 有意差検定には Student's *t*-test を用いた。

また, 有意水準は  $p < 0.05$  とした。

## 結果

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。

### 1. 延髄および C1-C2 領域における pERK-IR 細胞発現

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) および延髄の網様核 (RF) に多くの pERK-IR 細胞発現を認めた (第 2 図)。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 (2 図 B の矢印)。本研究で検出された pERK-IR 細胞は分布する部位や核で形態学的な違いは認められなかった。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。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 (第 2 図 B) が観察され、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、第 3 図に示したように、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。

## 2. 諸核における pERK-IR 細胞数の比較

Vc, NTS, Pa5 および RF において検出された pERK-IR 細胞数の違いを第 4 図に示した。それぞれの核から検出された pERK-IR 細胞数は、Vc と NTS がほぼ同数、Pa5 と RF がほぼ同数であった。また、Vc においてのみカプサイシン注入群の方が vehicle 注入群よりも有意に多くの pERK-IR 細胞数が検出された。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。

## 3. Vc および C1-C2 における pERK-IR 細胞の吻尾的広がり

本研究ではさらに、有意に多くの pERK-IR 細胞発現を認めた Vc および上部頸髄領域について、吻尾側的な pERK-IR 細胞数の分布様式について解析を行った。第 5 図に示したように、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  $\mu\text{m}$  尾側 (-3000  $\mu\text{m}$ ) 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  $\mu\text{m}$  吻側, 7500  $\mu\text{m}$  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で vehicle 投与群よりも多くの pERK-IR 細胞発現を認めた。

## 考察

### 1. Vc および C1-C2 領域に発現した pERK 陽性細胞の機能

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<sup>16-18)</sup>。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はっきりせず、体部位局在性がはっきりしないといわれている<sup>12)</sup>。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<sup>11,19)</sup>。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に一致しており、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<sup>12,20)</sup>。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、ほとん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<sup>21,22)</sup>。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<sup>11)</sup>。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<sup>11)</sup>。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。

## 2. NTS, Pa5 および RF に発現した pERK-IR 細胞の機能

これまでの研究により、NTSは嘔下誘発において重要な働きを有する中継核であるといわれている<sup>10-12)</sup>。この領域に入力した口腔内からの感覚情報によって嘔下反射が引き起こされ、内臓からの侵害情報を受けて自律神経系調節にも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<sup>23)</sup>。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明らかに抑制され、一方で交感神経刺激によって著明に亢進するといわれている<sup>24)</sup>。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<sup>25)</sup>。以上から、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<sup>26)</sup>, 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。この領域の機能を明らかにするには, 電気生理学的手法を用いた機能解析を行う必要があると思われる。

### 3. 嚥下反射変調機構に関する考察

Tsujimura らは, 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著明に回復したことを報告した<sup>6,7)</sup>。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。

## 結論

麻酔ラットの軟口蓋粘膜下へのカプサイシン投与によって、延髄および上部頸髄における pERK-IR 細胞発現様式について詳細な検討を加え、以下の結論を得た。

1. 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 Vc, NTS, Pa5 および RF に多くの pERK-IR 細胞発現が認められた。
2. pERK-IR 細胞は Vc において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、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。
3. カプサイシン注入により 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。
4. 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  $\mu\text{m}$  尾側の部位にピークを示す2峰性の分布を示していた。

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。

## 文 献

- 1) Jean A (2001) Brain stem control of swallowing: neuronal network and cellular mechanisms. *Physiol Rev* 81, 929-969.
- 2) Kajii Y, Shingai T, Kitagawa J, Takahashi Y, Taguchi Y, Noda T, Yamada Y (2002) Sour taste stimulation facilitates reflex swallowing from the pharynx and larynx in the rat. *Physiol Behav* 77, 321-325.
- 3) Kitagawa J, Shingai T, Takahashi Y, Yamada Y (2002) Pharyngeal branch of the glossopharyngeal nerve plays a major role in reflex swallowing from the pharynx. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 282, R1342-1347.
- 4) Bender IB (2000) Pulpal pain diagnosis--a review. *J Endod* 26, 175-179.
- 5) Ertekin C, Secil Y, Yuceyar N, Aydogdu I (2004) Oropharyngeal dysphagia in polymyositis/dermatomyositis. *Clin Neurol Neurosurg* 107, 32-37.
- 6) Tsujimura T, Kondo M, Kitagawa J, Tsuboi Y, Saito K, Tohara H, Ueda K, Sessle BJ, Iwata K (2009) Involvement of ERK phosphorylation in brainstem neurons in modulation of swallowing reflex in rats. *J Physiol* 587, 805-817.
- 7) Tsujimura T, Kitagawa J, Ueda K, Iwata K (2009) Inhibition of swallowing reflex following phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase in nucleus tractus solitarii neurons in rats with masseter muscle nociception. *Neurosci Lett*



450, 361-364.

- 8) Kessler JP, Jean A (1985) Identification of the medullary swallowing regions in the rat. *Exp Brain Res* 57, 256-263.
- 9) Kessler JP, Jean A (1986) Effect of catecholamines on the swallowing reflex after pressure microinjections into the lateral solitary complex of the medulla oblongata. *Brain Res* 386, 69-77.
- 10) Kessler JP, 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, 151-158.
- 11) Dubner R, Sessle BJ (1971) Presynaptic excitability changes of primary afferent and corticofugal fibers projecting to trigeminal brain stem nuclei. *Exp Neurol* 30, 223-238.
- 12) Noma N, Tsuboi Y, Kondo M, Matsumoto M, Sessle BJ, Kitagawa J, Saito K, Iwata K (2008) Organization of pERK-immunoreactive cells in trigeminal spinal nucleus caudalis and upper cervical cord following capsaicin injection into oral and craniofacial regions in rats. *J Comp Neurol* 507, 1428-1440.
- 13) Dai Y, Iwata K, Fukuoka T, Kondo E, Tokunaga A, Yamanaka H, Tachibana T, Liu Y, Noguchi K (2002) Phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase in

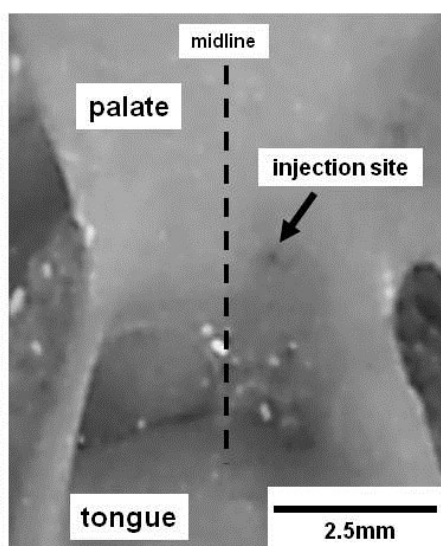
- primary afferent neurons by noxious stimuli and its involvement in peripheral sensitization. *J Neurosci* 22, 7737-7745.
- 14) Suzuki I, Tsuboi Y, Shinoda M, Shibuta K, Honda K, Katagiri A, Kiyomoto M, Sessle BJ, Matsuura S, Ohara K, Urata K, Iwata K (2013) Involvement of ERK phosphorylation of trigeminal spinal subnucleus caudalis neurons in thermal hypersensitivity in rats with infraorbital nerve injury. *PLoS One* 8, e57278.
- 15) Zimmermann M (1983) Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16, 109-110.
- 16) Sessle BJ (1987) The neurobiology of facial and dental pain: present knowledge, future directions. *J Dent Res* 66, 962-981.
- 17) Wang H, Wei F, Dubner R, Ren K (2006) Selective distribution and function of primary afferent nociceptive inputs from deep muscle tissue to the brainstem trigeminal transition zone. *J Comp Neurol* 498, 390-402.
- 18) Ren K, Dubner R (2011) The role of trigeminal interpolaris-caudalis transition zone in persistent orofacial pain. *Int Rev Neurobiol* 97, 207-225.
- 19) Dubner R, Bennett GJ (1983) Spinal and trigeminal mechanisms of nociception. *Annu Rev Neurosci* 6, 381-418.
- 20) Shimizu K, Asano M, Kitagawa J, Ogiso B, Ren K, Oki H, Matsumoto M, Iwata K

- (2006) Phosphorylation of Extracellular Signal-Regulated Kinase in medullary and upper cervical cord neurons following noxious tooth pulp stimulation. *Brain Res* 1072, 99-109.
- 21) Iwata K, Imai T, Tsuboi Y, Tashiro A, Ogawa A, Morimoto T, Masuda Y, Tachibana Y, Hu J (2001) Alteration of medullary dorsal horn neuronal activity following inferior alveolar nerve transection in rats. *J Neurophysiol* 86, 2868-2877.
- 22) Iwata K, Tashiro A, Tsuboi Y, Imai T, Sumino R, Morimoto T, Dubner R, Ren K (1999) Medullary dorsal horn neuronal activity in rats with persistent temporomandibular joint and perioral inflammation. *J Neurophysiol* 82, 1244-1253.
- 23) Cui RJ, Roberts BL, Zhao H, Andresen MC, Appleyard SM (2012) Opioids inhibit visceral afferent activation of catecholamine neurons in the solitary tract nucleus. *Neuroscience* 222, 181-190.
- 24) Yamazaki Y, Ren K, Shimada M, Iwata K (2008) Modulation of paratrigeminal nociceptive neurons following temporomandibular joint inflammation in rats. *Exp Neurol* 214, 209-218.
- 25) Caous CA, Koepp J, Couture R, Balan AC, Lindsey CJ (2008) The role of the

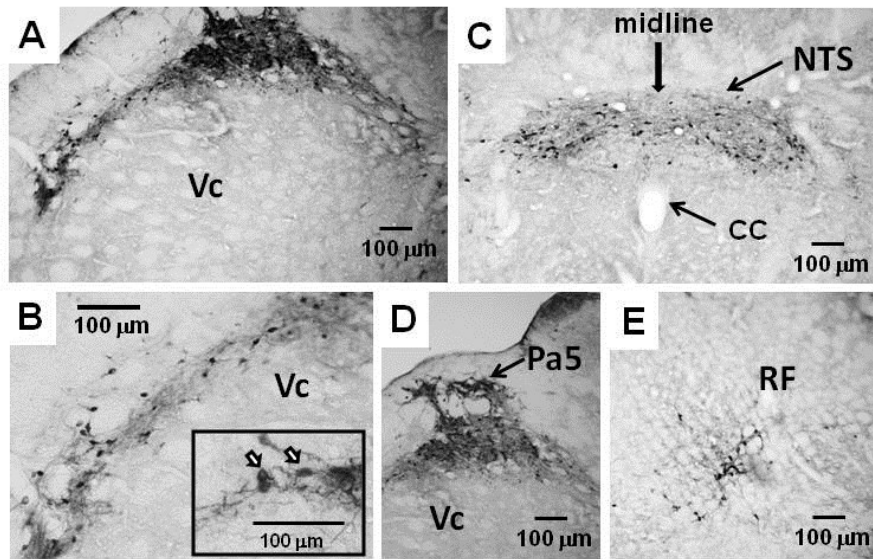
paratrigeminal nucleus in the pressor response to sciatic nerve stimulation in the rat. *Auton Neurosci* 140, 72-79.

26) Koganezawa T, Shimomura Y, Terui N (2008) The role of the RVLM neurons in the viscerosympathetic reflex: a mini review. *Auton Neurosci* 142, 17-19.

|



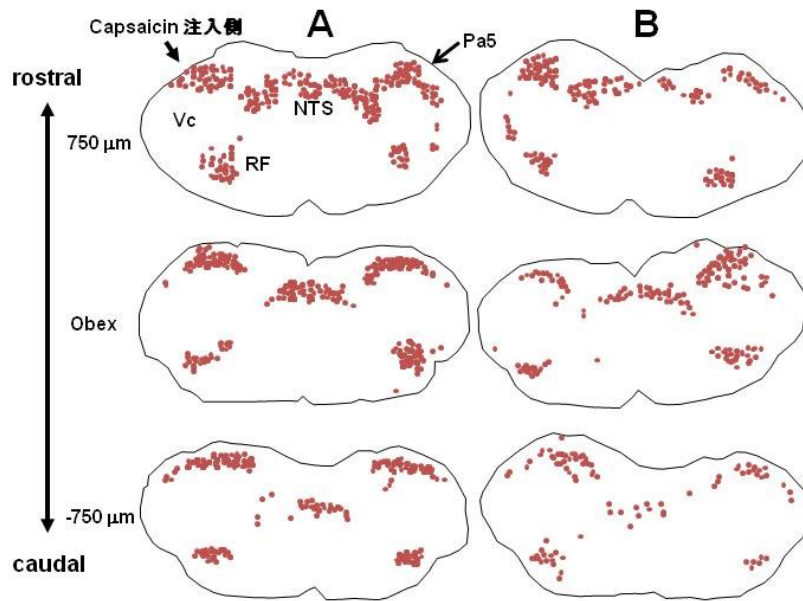
第1図  
軟口蓋部におけるcapsaicin投与部位の一例



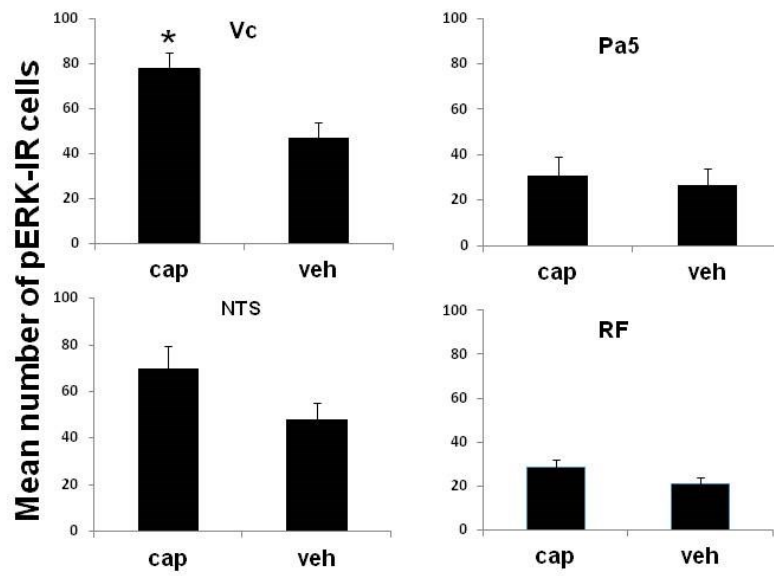
第2図

軟口蓋粘膜下へのcapsaicin注入によって諸核に発現したpERK-IR細胞の組織標本写真

Vc：三叉神経脊髄路核尾側亜核，Pa5：三叉神経上核，NTS：孤束核，cc：中心管，RF：網様体



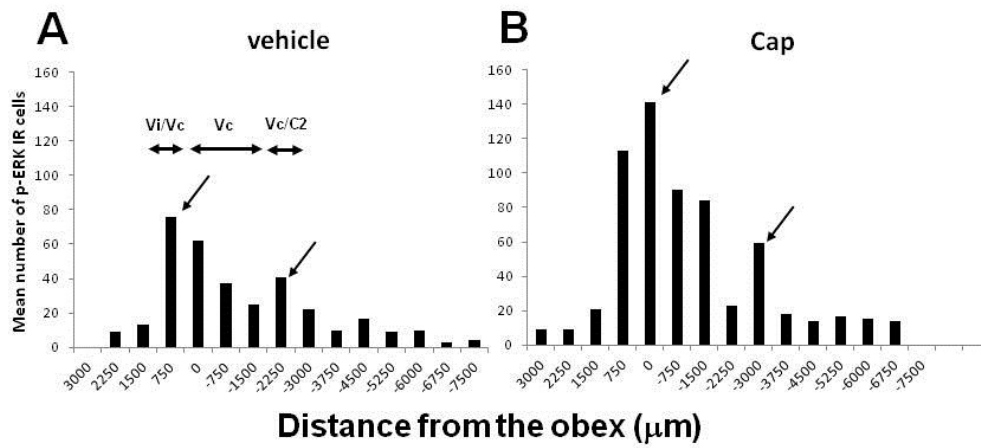
第3図  
 諸核に発現したpERK-IR細胞のプロット



第4図

諸核におけるcapsaicinおよびvehicle投与ラットのpERK-IR細胞数  
 Cap: capsaicin, veh : vehicle, Vc: 三叉神経脊髄路核尾側亜核, Pa5: 三叉上核, NTS: 孤束核, RF: 網様核





第5図

VcおよびC1-C2領域におけるpERK-IR細胞の吻尾側の広がり

→：各グラフにおけるピーク