

論文の内容の要旨

氏名：北 梢

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：咽頭部の侵害入力を受ける延髄ニューロンの分布様式

咀嚼・嚥下過程が円滑に行なわれるためには、口腔や咽頭からの感覚情報が重要な働きを有することが知られており、口腔や咽頭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。特に咽頭部は食塊が通過する非常に狭い部位であるため、この部位の粘膜に感覚障害が引き起こされると、円滑な嚥下運動が阻害されて QOL が著しく低下すると考えられている。しかし、咽頭粘膜の感覚障害がいかなるメカニズムで咀嚼・嚥下運動に影響を及ぼすか、あるいは咽頭粘膜の侵害情報が運動制御にどのように関与するかについては明らかにされていない。

咀嚼・嚥下運動を司る中枢神経領域は三叉神経運動核と疑核であることが報告されている。これらの神経核には咀嚼・嚥下に関与する筋を支配する運動ニューロンが存在するが、この運動ニューロンは口腔内や咽頭部から様々な感覚情報を受け、ニューロン活動が調節されている。一方、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) および上部頸髄 (C1-C2) に投射し、これらの領域に存在する侵害受容ニューロン活動が亢進され、最終的に口腔顔面領域の痛みが認知される。口腔の侵害情報を受ける Vc および C1-C2 領域の侵害受容ニューロンは、顔面からの侵害情報を受ける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し、広い受容野を有し、体部位局在性がはっきりしないと報告されている。これに対し、嚥下機能調節に重要と考えられている咽頭部粘膜からの侵害情報に関しては全く報告がなされておらず、咽頭部の痛みがどのような神経機構で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、自由神経終末に存在する transient receptor potential vanilloid receptor 1 (TRPV1) のリガンドとして知られている capsaicin を麻酔下でラットの咽頭粘膜下に注入することによって C 線維を活性化させ、咽頭部に分布する C 線維の刺激によって活性化される延髄ニューロンの分布様式を解析した。本研究では、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を用い、咽頭粘膜の侵害刺激によって発現するリン酸化 ERK 免疫 (pERK-IR) 陽性細胞の延髄における分布様式を検索し、咽頭の侵害情報処理機構の一端を明らかにした。

2% isoflurane にて麻酔し、さらに Sodium pentobarbital (50 mg/kg, i.p.) で深く麻酔したラットをウォームマット上に仰臥位で寝かせた状態で開口器を用いて開口させ、左側咽頭粘膜に 300 μ M capsaicin 溶液 (10 μ l) を静かに注入した。Capsaicin 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 300 μ M とした。また、vehicle として capsaicin の溶媒を同量、左側咽頭粘膜下に注入し、このラットをコントロールとした。Capsaicin 注入 5 分後、ラットを再度 sodium pentobarbital (80 mg/kg, i.p.) で深く麻酔し、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, 4°C) 500 ml を用いて灌流固定を行った。灌流固定終了後に延髄を含む全脳部位を摘出し、同様の固定液で 4°C 2 日間、後固定を行った。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% スクロース溶液に移し換え、2 日間、4°C に保存した。一昼夜 4°C で保存した脳標本をドライアイスで凍結し、マイクロームを用いて三叉神経脊髄路核を含む延髄の連続切片標本 (厚さ 50 μ m) を作製し、以下の方法によって nickel-cobalt 加 3,3'-diaminobenzidine tetra hydrochloride (DAB) 染色を施した。まず、厚さ 50 μ m の切片を、0.3% H₂O₂ 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 3 回行った。洗浄終了後、0.3% Triton X 100 / 5% normal goat serum (NGS)-PBS に 1 時間浸漬し、ブロッキングを行った。その後、4°C で一次抗体である rabbit anti phosphor-p44/ 42 MAP kinase antibody (1: 1000) に 3 日間浸漬し、0.01 M PBS にて洗浄し、切片を二次抗体である biotinylated goat anti-rabbit IgG (H+L) (1:

600) に室温で2時間浸漬した。その後 ABC kit 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、0.01% hydrogen peroxide 加 DAB を用いて反応産物を可視化した。次いで、切片を0.01 M PBS にて洗浄し、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水・透徹を行い、封入した。また、pERK-IR 陽性細胞を DAB 反応させた切片を光学顕微鏡下で観察し、Neuro-Lucida を用いて描画し、分布状態および pERK-IR 陽性細胞数の解析を行った。

咽頭粘膜下に capsaicin あるいは vehicle を微量投与し5分経過したラットの延髄において、Vc の背側部、Vc 腹側部の網様体領域 (RF)、孤束核 (NTS) および三叉神経上核 (Pa5) から pERK-IR 陽性細胞が検出された。pERK-IR 陽性細胞数は Vc と Pa5 に多く、他の領域においては少数であった。また、本研究で観察された pERK-IR 陽性細胞は細胞質および核が共に黒色に濃染されたドット状を成していた。Vc で検出された pERK-IR 陽性細胞は直径約 20 μm 程度の卵型の細胞体と多くの線維を有するニューロンの形状を有しており、分布領域が異なっているにもかかわらず、その形態に違いは認められなかった。また、濃染された線維には小さな膨らみを有するものが多数認められ、線維上に連続的に観察されることから、これらはブートンである可能性が高いと考えられる。本研究では、細胞質および核が黒色に濃染された細胞を免疫陽性細胞として判断して顕微鏡下で検出し、Neuro-Lucida で描画しパーソナルコンピュータ上に表して pERK-IR 陽性細胞数を算出した。capsaicin および vehicle 投与ラットともに、Vc および Pa5 において両側性に分布していたが、同側においてより多くの pERK-IR 陽性細胞発現を認めたのに対し、NTS および Vc 腹側部の RF において全く左右差は認められなかった。

さらに、吻尾側方向における pERK-IR 陽性細胞分布様式をみると、capsaicin 投与群および vehicle 投与群のどちらも、capsaicin 投与と同側において、obex から 150 μm 吻側部と obex から 300 μm 尾側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 750 μm 吻側、600 μm 尾側部に広がっていた。これまでの研究に従うと、pERK-IR 陽性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の移行部領域である Vi/Vc に相当すると考えられる。さらに、ピークを示した領域付近において、capsaicin 投与群で vehicle 投与群よりも有意に多くの pERK-IR 陽性細胞発現を認めた。また、このような分布様式は刺激と対側においても認められた。Vc において検出された pERK-IR 陽性細胞は、capsaicin 注入と同側において、capsaicin 注入群の方が vehicle 注入群よりも有意に多かった。また、capsaicin 注入の対側においても capsaicin 投与群においてやや多い傾向を認めたが、有意差は認められなかった。Pa5 で検出された pERK-IR 陽性細胞は、注入と同側において capsaicin 注入群の方が vehicle 注入群よりも有意に多かった。また、capsaicin 注入の対側においても Vc で観察されたのと同様に capsaicin 投与群においてやや多い傾向を認めたが、有意差は認められなかった。

以上の結果から、咽頭粘膜の侵害入力を受ける Vc の侵害受容ニューロンは咽頭部の痛みを、NTS および Pa5 の侵害受容ニューロンは嚥下反射調節以外に、咽頭の侵害情報処理にも関与する可能性が示された。