

咽頭部の侵害入力を受ける延髄ニューロンの分布様式

日本大学大学院歯学研究科歯学専攻

北 梢

(指導：岩田 幸一 教授，篠田 雅路 准教授，片桐 綾乃 助教)

緒言

口腔に取り入れられた食物は咀嚼され食塊となって咽頭へと運ばれ、嚥下される。このような一連の咀嚼・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¹⁻³⁾。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⁴⁾。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。咽頭粘膜からの侵害情報による咀嚼・嚥下運動制御機構を明らかにすることによって、咀嚼・嚥下障害の正確な診断あるいは適切な治療の裏付けを得ることができる。

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⁵⁾。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⁶⁾。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^{7, 8)}。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⁸⁾。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) のリン酸化を組織学的に検出する方法を用いた⁹⁾。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始まると報告されている⁸⁾。また、抗リン酸化ERK (pERK) 抗体に対して免疫陽性を示す細

胞（pERK-IR 陽性細胞）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¹⁰⁾。このような結果から、pERK-IR 陽性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考えられている^{8,9)}。

そこで本研究では、pERK を神経興奮のマーカーとして用い、咽頭粘膜の侵害刺激によって発現する 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。

材料および方法

本研究は、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¹¹⁾。実験には Sprague-Dawley 系雄性ラット 10 匹を用いた。

1. Capsaicin 投与

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, 和光) を静かに注入した (第 1 図の矢印で示した部位)。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 (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。

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°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、ミクロトーム (Leica) 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 μm) を作製して 3 切片毎に 1 切片を取り出し、以下の方法によって nickel-cobalt 加 3,3'-diaminobenzidine tetra hydrochloride (DAB, 東京化成) 染色を施した。まず、厚さ 50 μm の切片を、0.3% H_2O_2 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 10 分間の洗浄を 3 回行った。次いで切片を二次抗体である biotinylated goat anti-rabbit IgG (H+L) (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、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、MAS-GP(Matsunami)でコートし

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水・透徹を行い、封入剤 (Thermo Scientific) を用いて封入した。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 (Micro Bright Field) 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。

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

麻酔ラット咽頭部粘膜下に capsaicin を投与し (第 1 図), 延髄領域に発現する pERK-IR 陽性細胞の分布様式を詳細に検討した。

1. 延髄における pERK-IR 陽性細胞発現

第 2 図には, 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 (capsaicin 投与, A : 投与と同側, B : 投与の反対側 ; vehicle 投与, C : 投与と同側), Vc 腹側部の網様体領域 (RF, E : 投与と同側), 孤束核 (NTS, D : 投与と同側) および三叉神経上核 (Pa5, F : 投与と同側, G : 投与と対側) で観察された pERK-IR 陽性細胞の代表例を示した。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 陽性細胞は第 2 図の顕微鏡写真では黒色のドット状の構造物として観察されたが, より強拡大で観察すると直径約 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 (第 3 図), 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（第3図の矢印）。本研究では、第3図に示したような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。第4図にNeuro-Lucidaにて切片を描画した分布図を示した。この分布図から明らかなように、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においては全く左右差は認められなかった。

2. VcにおけるpERK-IR陽性細胞の吻尾側方向の広がり

本研究ではさらに、有意に多くのpERK-IR陽性細胞発現を認めたVcについて、吻尾側的なpERK-IR陽性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、capsaicin投与群およびvehicle投与群のどちらも、pERK-IR陽性細胞はcapsaicin投与と同側において、obexから150 μ m吻側部（150 μ m）とobexから300 μ m尾側（-300 μ m）の部位にピークを示す2峰性の分布を示していた（第5図Aの矢印）。また、その分布範囲はobexから約750 μ m吻側、600 μ m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（第 5 図 B）。

3. Vc における pERK-IR 陽性細胞数の比較

Vc において検出された pERK-IR 陽性細胞数の違いを第 6 図に示した。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。

4. Pa5 における pERK-IR 陽性細胞数の比較

Pa5 において検出された pERK-IR 陽性細胞数の違いを第 7 図に示した。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。

考察

1. 咽頭侵害情報処理に対する Vc ニューロンの働き

従来の研究から Vc には口腔顔面領域からの侵害情報が強く投射すると報告されている¹²⁾。また、口腔顔面領域から侵害情報を受ける Vc および C1-C2 ニューロンの分布様式を、pERK-IR 陽性細胞を指標に解析した研究結果が報告されている^{12,13)}。それによると、顔面皮膚の侵害刺激によって発現する pERK-IR 陽性細胞は刺激と同側に比較的限局して検出されるのに対して口腔内の侵害情報を受けるニューロンは Vc および Vc および C1-C2 において、両側性に分布していた。口腔内では、舌への capsaicin 投与によって検出された pERK-IR 陽性細胞は Vc の背側部に限局しているのに対して三叉神経第 II 枝支配領域である硬口蓋への capsaicin 注入によって発現する pERK-IR 陽性細胞は C1-C2 領域の中央部から腹側部にかけての領域から検出された¹³⁾。しかし、これらの分布は移行的で境界は不明瞭であった。本研究で咽頭部への capsaicin 注入によって検出された pERK-IR 陽性細胞は Vc においては背側部に限局していた。また、この発現は舌への capsaicin 注入において認められる分布に類似していた。このような結果を勘案すると、咽頭部の侵害情報処理に関与する Vc 領域は舌の侵害情報処理に関与する領域とオーバーラップしており、Vc の背側部領域に存在する侵害受容ニ

ニューロンは舌と咽頭の両方の侵害情報処理に関与している可能性が示された。また、舌の侵害情報を受けるニューロンも咽頭からの侵害情報を受けるニューロンも両側性の分布を示し、吻尾側的に長い領域に分布していることから、侵害情報の場所弁別能が弱い可能性が考えられる。さらに、これまでの研究では口腔顔面領域の侵害刺激によって Vc および C1-C2 領域で検出される pERK-IR 陽性細胞は 2 峰性の分布を示すことが報告されている¹⁴⁾。本研究でも、咽頭への capsaicin 刺激によって検出された pERK-IR 陽性細胞は同様に 2 峰性の分布を示していた。また、尾側部のピークを示す pERK-IR 陽性細胞は刺激強度依存性に発現数の増加を示すことから、この領域のニューロンは口腔顔面領域の疼痛弁別に関与する可能性が考えられている⁸⁾。従来の結果と本研究結果から pERK-IR 陽性細胞の機能を考えると、本研究で認められた尾側部でのピークを示す領域に分布する pERK-IR 陽性細胞は咽頭部の痛覚弁別に関与する可能性が高い。

2. NTS の咽頭侵害情報処理に対する役割

これまでの様々な研究から、NTS に存在するニューロンは内臓感覚あるいは嚥下運動制御に関与することが明らかにされている¹⁵⁾。またこの領域のニューロンは自律神経系の機能制御にも関係していることから、全身に加えられた

様々な侵害刺激によって活性化すると考えられ、侵害情報処理に関してはいわゆる侵害情報の弁別の様相を担っておらず、情動的な側面に関与している可能性が考えられている¹²⁾。本研究においても、NTS で検出された pERK-IR 陽性細胞は vehicle 注入によっても両側性に多く認められた。このような結果から、本研究で NTS において観察された pERK-IR 陽性細胞は咽頭の侵害情報処理というよりも、その刺激によって引き起こされた自律神経応答による間接的な反応を反映している可能性があると考えられる。

3. RF の咽頭侵害情報処理に対する役割

本研究では Vc の腹側部に位置する RF に少数ではあるが pERK-IR 陽性細胞発現が認められた。RF に関しては、特徴的な機能があるという報告がない。そのため、この領域に存在するニューロンが侵害受容に対していかなる機能を担っているかははっきりしていない。過去の論文で Vc の腹側部から内側部の RF に存在する侵害受容ニューロンの応答性に関する報告がなされたが、受容野特性や侵害刺激に対する応答性などは、帯状回や島皮質などの辺縁皮質から記録される侵害受容ニューロンに類似しているといわれている¹⁶⁾。しかし、本研究結果からこの領域に存在する侵害受容ニューロンが口腔顔面領域の侵害情報処理に対してなんらかの関与を有する可能性は否定できない。

4. Pa5 の咽頭侵害情報処理に対する役割

Pa5 はこれまでの研究により，迷走神経刺激によって応答性が減弱し，交感神経刺激によって増加すると報告され，自律神経系の応答性に強く関与している可能性が示されてきた¹⁷⁾。本研究でも，Pa5 では多くの pERK-IR 陽性細胞が両側性に検出された。しかし，capsaicin 刺激だけでなく vehicle 刺激に対しても多くの pERK-IR 陽性細胞発現が認められており，これらのニューロンが咽頭の侵害刺激以外の要素によって活性化した可能性を否定することはできない。おそらく，この領域から検出された pERK-IR 陽性細胞のあるものは自律神経系の応答制御に，またあるものは咽頭の侵害情報処理に関与する可能性が考えられる。

結論

麻酔ラットの咽頭粘膜下への capsaicin 投与によって、延髄および上部頸髄における pERK-IR 陽性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. 咽頭粘膜下に capsaicin を微量投与したラットの延髄では、Vc の背側部と Vc 腹側部の RF, Pa5 および NTS に pERK-IR 陽性細胞発現を認めた。
2. Capsaicin および vehicle 投与ラットともに、Vc および Pa5 において刺激と同側で多くの pERK-IR 陽性細胞発現を認めたのに対し、NTS および RF においては、発現数において左右差は認められなかった。
3. Capsaicin 投与群および vehicle 投与群のどちらも、pERK-IR 陽性細胞は capsaicin 投与と同側において、obex から 150 μ m と obex から -300 μ 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 750 μ m, -600 μ m の範囲に広がっていた。
4. Vc および Pa5 において検出された pERK-IR 陽性細胞数は同側において、capsaicin 注入群の方が vehicle 注入群より有意に多かった。

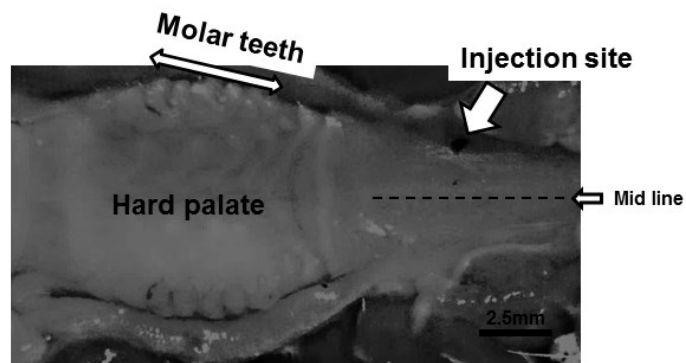
以上の結果から、咽頭粘膜の侵害入力を受ける Vc の侵害受容ニューロンは咽頭部の痛みを、NTS および Pa5 の侵害受容ニューロンは嚥下反射調節以外に、咽頭の侵害情報処理にも関与する可能性が示された。

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 and 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 and 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) Lowell S Y, Poletto C J, Knorr-Chung B R, Reynolds R C, Simonyan K and Ludlow C L (2008) Sensory stimulation activates both motor and sensory components of the swallowing system. *Neuroimage* 42, 285-295.
- 5) Lang I M (2009) Brain stem control of the phases of swallowing. *Dysphagia* 24, 333-348.
- 6) Kecskes S, Matesz C and Birinyi A (2013) Termination of trigeminal primary afferents on glossopharyngeal-vagal motoneurons: possible neural networks underlying the swallowing phase and visceromotor responses of prey-catching behavior. *Brain Res Bull* 99, 109-116.

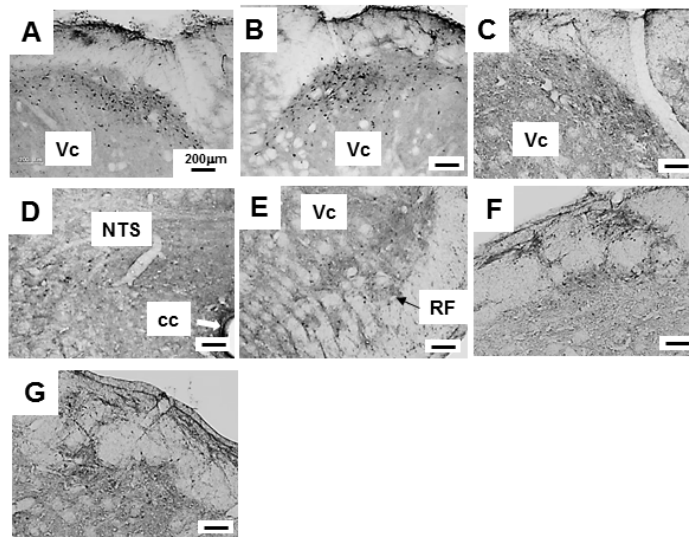
- 7) Dubner R and Sessle B J (1971) Presynaptic excitability changes of primary afferent and corticofugal fibers projecting to trigeminal brain stem nuclei. *Exp Neurol* 30, 223-238.
- 8) Noma N, Tsuboi Y, Kondo M, Matsumoto M, Sessle B J, Kitagawa J, Saito K and Iwata K (2008) Organization of pERK-immunoreactive 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.
- 9) Dai Y, Iwata K, Fukuoka T, Kondo E, Tokunaga A, Yamanaka H, Tachibana T, Liu Y and 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.
- 10) Suzuki I, Tsuboi Y, Shinoda M, Shibuta K, Honda K, Katagiri A, Kiyomoto M, Sessle B J, Matsuura S, Ohara K, Urata K and 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.
- 11) Zimmermann M (1983) Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16, 109-110.

- 12) Sessle B J (2011) Peripheral and central mechanisms of orofacial inflammatory pain. *Int Rev Neurobiol* 97, 179-206.
- 13) 北大樹 (2014) 嚙下痛に關与する延髓および上部頸髓ニューロンの同定. *日大齒学* 88, 15-20.
- 14) Shoda E, Kitagawa J, Suzuki I, Nitta-Kubota I, Miyamoto M, Tsuboi Y, Kondo M, Masuda Y, Oi Y, Ren K and Iwata K (2009) Increased phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase in trigeminal nociceptive neurons following propofol administration in rats. *J Pain* 10, 573-585.
- 15) Tsujimura T, Kondo M, Kitagawa J, Tsuboi Y, Saito K, Tohara H, Ueda K, Sessle B J and Iwata K (2009) Involvement of ERK phosphorylation in brainstem neurons in modulation of swallowing reflex in rats. *J Physiol* 587, 805-817.
- 16) Robbins M T, Uzzell T W, Aly S and Ness T J (2005) Visceral nociceptive input to the area of the medullary lateral reticular nucleus ascends in the lateral spinal cord. *Neurosci Lett* 381, 329-333.
- 17) Yamazaki Y, Ren K, Shimada M and Iwata K (2008) Modulation of paratrigeminal nociceptive neurons following temporomandibular joint inflammation in rats. *Exp Neurol* 214, 209-218.



第1図

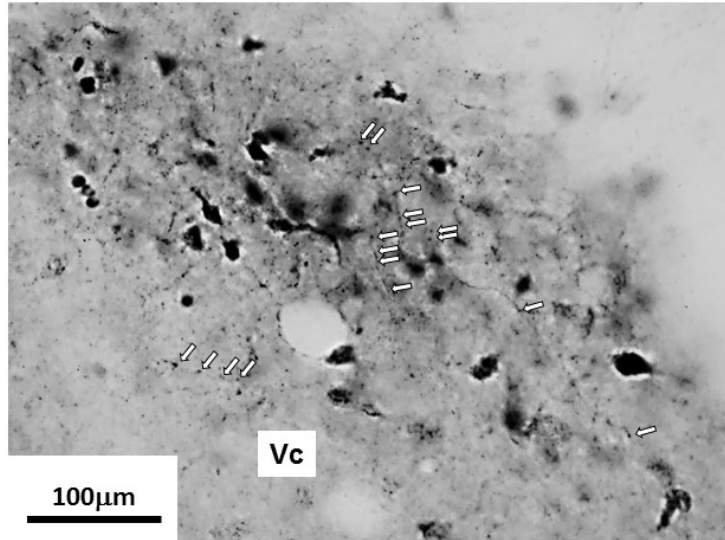
中咽頭部におけるcapsaicin注入部位, エバンスブルーを混ぜた 300 μ M capsaicinを粘膜下に注入し, 確認された注入部位



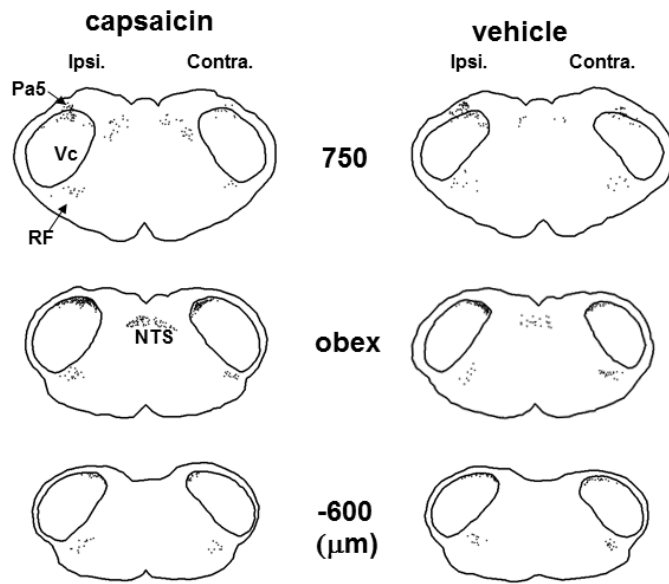
第2図

pERK-IR細胞が検出された延髄領域の顕微鏡写真

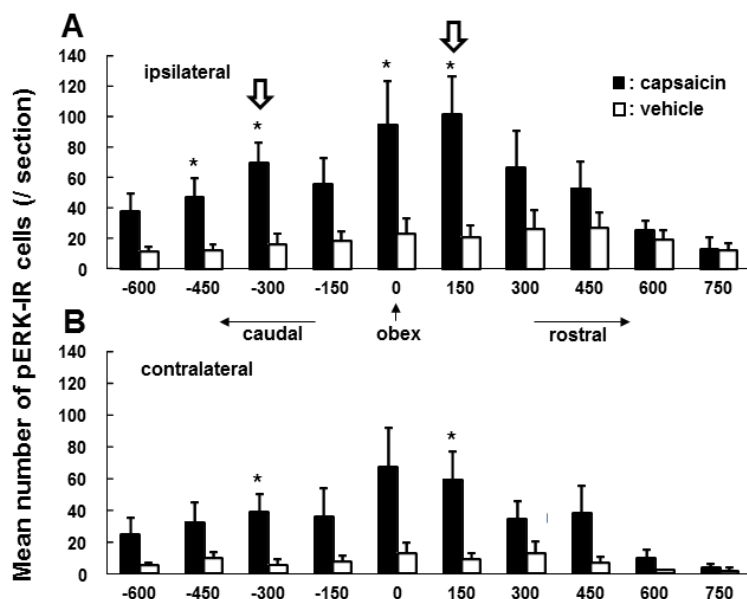
A: capsaicin投与と同側の三叉神経脊髄路核尾側垂核 (Vc), B: capsaicin投与と対側のVc, C: vehicle投与と同側のVc, D: capsaicin投与と対側の孤束核 (NTS), E: capsaicin投与と同側の網様体 (RF), F: capsaicin投与と同側の三叉神経上核 (Pa5), G: capsaicin投与と対側の Pa5, cc: 中心管



第3図
Capsaicin 投与と同側のVcで観察されたpERK-IR細胞の強拡大顕微鏡写真
白抜き矢印はブートンと考えられる膨瑠である。



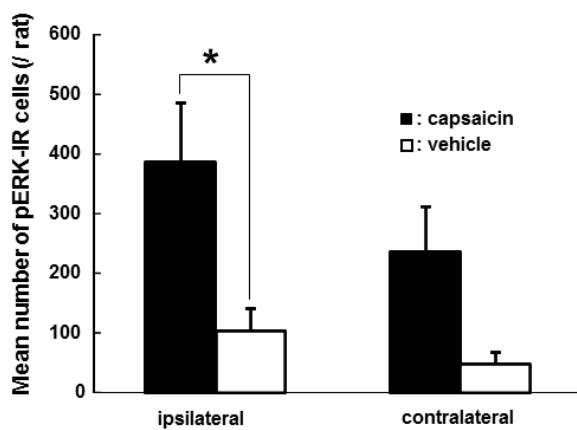
第4図
pERK-IR細胞が検出された切片のニューロルシーダ描画図



第5図

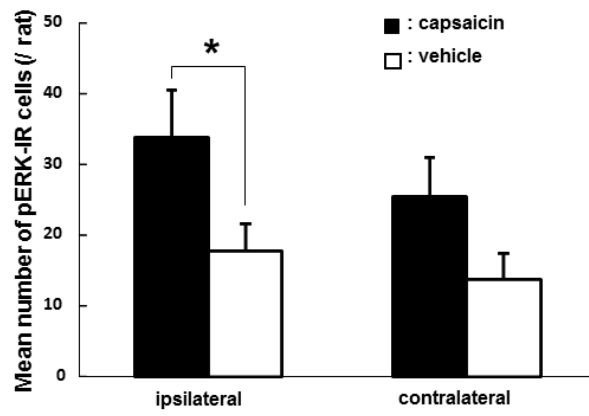
Vcにおいて検出されたpERK-IR細胞の吻尾側方向における分布

* : $p < 0.05$



第6図

Capsaicin投与ラットおよびvehicle投与ラットにおいて、Vcにおいて検出されたpERK-IR細胞数の比較, * : $p < 0.05$



第7図

Capsaicin投与ラットおよびvehicle投与ラットにおいて、Pa5で検出されたpERK-IR細胞数の比較, * : $p < 0.05$