電気生理学のアプローチによる喉頭基礎研究

杉 山 庸一郎

An Electrophysiological Approach to Basic Laryngology

Yoichiro Sugiyama

Laryngeal movements including breathing, phonation, and airway protective reflexes, such as swallowing and coughing, are mainly controlled by the neuronal networks in the brain stem. To understand the mechanisms underlying these movements, the morphological and functional properties of the brain stem neurons that participate in the production of these movements should be investigated. We previously examined the functional roles of the brain stem neurons that contribute to the generation of laryngeal movements using electrophysiological and morphological procedures. The findings of two studies are introduced in the presentation. In the first study, we reported the projections of the swallow-related neurons in the swallowing central pattern generator in the medulla oblongata using a tracer injection in anesthetized paralyzed guinea pigs. This study indicated that the swallow-related neurons were broadly distributed in the nucleus tractus solitarius and reticular formation, and that there appeared to be complex interconnections amongst the nucleus tractus solitarius, the reticular formation, and the cranial motor nuclei. The other study showed that the activity of the respiratory neurons in the ventrolateral medulla, in particular between the Bötzinger complex and the rostral ventral respiratory group, was altered during fictive vocalization, swallowing, and coughing in a type-specific manner, and thus supported the hypothesis that the medullary respiratory neurons are multifunctional and that the respiratory center in the network circuitry underlying these behaviors can be shared.

Key words : laryngology, electrophysiology, vocalization, swallowing

はじめに

喉頭は耳鼻咽喉科領域において、最もメカニカルな器官の一つである。安静呼吸時は呼吸関連運動を行っている声帯が、嚥下、咳などの気道防御反射時、あるいは発声時に急激にその活動パターンを変化させ、それぞれの振る舞いに適した運動を行う。従って、喉頭科学の研究を行う上で、この動的に「動く」喉頭の制御機構を解明することは非常に重要である。そして、喉頭運動制御メカニズムを解析するために、生理学、特に電気生理学は合目的である。我々はこれまで、電気生理学的研究手法を主に用いて喉頭科学の基礎研究を行ってきた。本稿は我々の研究を理解するための基礎的な知識と、これまで行ってきた研究内容の一部を示すものである。

電気生理学研究の基礎

活動電位とその記録(ニューロン, 神経, 筋肉)

運動ニューロン(Motoneuron)へ投射するPremotor neuronのシナプス前終末から放出された神経伝達物質により運動ニューロン細胞内にシナプス後電位が発生する。そして、ニューロンの膜電位が閾値を超えると活動電位が発生する。神経細胞で発生した活動電位は減衰することな

く軸索に沿って伝播し、支配筋の終板へ向かう。運動神経は終板に近づくときミエリン鞘を失いシナプス前終末を形成する。活動電位が終板に到達するとアセチルコリンが放出され、神経筋接合部を介して筋線維の膜に活動電位を発生させる。このようにPremotor neuronからの制御を受けたMotoneuronは支配筋を駆動するのである。ある運動を観察する場合、その筋活動を記録することが重要であるが、その場合は筋肉に発生するこの活動電位を記録する筋電図が使用される。実験系によっては筋活動を筋弛緩剤で抑制した上で運動を記録する必要もあり、その場合は軸索を伝播する活動電位を記録する神経電図が用いられる。また、運動を制御するニューロンの活動自体を解析する場合、ニューロンに発生した活動電位を細胞外で記録する方法(細胞外記録)と細胞内に電極を刺入し、膜電位を計測する方法(細胞内記録)が用いられる。筋活動あるいは神経活動を複数同時に記録することで、様々な複雑な運動の記録や解析を行うことが出来る。ニューロン活動については個々のニューロンの活動パターンを解析するだけでなく、その入力様式や接続を解析することで、それぞれのニューロンのネットワーク内での役割を類推することが出来る。本稿で主に使用されている細胞外記録ではその中でも活動パターンの解析を主に行っている。

呼吸性、非呼吸性運動とその誘発

1, 呼吸

呼吸運動は横隔膜、外肋間筋などの吸気筋収縮による吸気とそれに引き続く腹直筋や腹斜筋などの呼気筋収縮による呼気で構成されている。これらの筋肉は呼吸筋とも呼ばれているが、咽頭や喉頭を動かす筋肉も安静呼吸時は呼吸関連運動を行う。例えば咽頭筋の多くは呼気性活動を示すし、声帯内転筋は呼気性に外転筋は吸気性に活動している。このように咽頭喉頭も安静呼吸時は呼吸中枢による制御を受けている。呼吸時声帯運動については、声帯内転筋である甲状披裂筋は呼気早期に収縮し、肺の虚脱を防いでいる。また、後輪状披裂筋や輪状甲状筋は吸気時に活動し、吸気時の声門腔を保っている。このような呼吸性喉頭運動を制御する呼吸中枢は脳幹に存在している¹⁾。延髄には孤束核の腹外側に背側呼吸ニューロン群 (Dorsal respiratory group) が、延髄腹外側には尾側腹側呼吸ニューロン群 (caudal ventral respiratory group, cVRG)、吻側腹側呼吸ニューロン群 (rostral ventral respiratory group, rVRG)、pre Bötzing complex (pre BötC)、Bötzing complex (BötC)、Retrotrapezoid nucleus/parafacial respiratory groupが存在している²⁾。また、橋背外側領域には橋呼吸ニューロン群 (Pontine respiratory group, PRG) と呼ばれるニューロン群が存在している²⁾。cVRG、BötCには喉頭運動ニューロンに投射するニューロンが存在し、PRGも声帯内転筋の呼気性活動を制御しているといわれており³⁾、喉頭運動制御に関与している。このように、呼吸時声帯運動は呼吸中枢の様々な領域からの制御を受けている。

2, 発声

発声運動も脳幹の制御を受けている。発声の制御経路についてはAnterior cingulate cortexからMidbrain periaqueductal gray (PAG) を経由して後疑核 (Nucleus reticulobulbosus, NRA) へ投射し、そこから疑核 (Nucleus ambiguus, NA) に存在する運動ニューロンへ投射する経路、また、Motor cortexから網様体を経由してNAに向かう経路が存在している⁴⁾。PAGは発声のいわゆるgateの役割を担っており、PAGへの電気刺激あるいは化学刺激により発声が誘発される⁴⁾。発声時声帯は内転、伸長し、強い呼気に伴って声帯粘膜波動が生じることで喉頭原音が生成される。この時、甲状披裂筋および輪状甲状筋の強い収縮が見られ、特に呼吸時に吸気優位で活動する輪状甲状筋が呼気優位にシフトするのが発声の特徴とされている。発声運動は音声と同時に上気管筋の特徴的な活動パターンとして記録される⁵⁾。

3, 嚥下

嚥下は口腔期、咽頭期、食道期に分類されるが、咽頭期嚥下は特に再現性の高いパターン化された不随意運動と考えられている^{6,7)}。咽頭期嚥下時は顎舌骨筋、オトガイ舌骨筋の収縮に続き、咽頭収縮筋の連続的な収縮と甲状舌骨筋収縮が起きる。さらに声門閉鎖が起これ、輪状咽頭筋の弛緩により食塊が食道に運ばれる⁸⁾。これらの運動は主に

舌下神経、迷走神経咽頭枝、反回神経などにより制御されており、この一連のパターン生成は主に延髄で行われている⁷⁻⁹⁾。咽頭期嚥下の確認は咽頭収縮筋、甲状舌骨筋、甲状披裂筋の嚥下関連活動などが指標として用いられる。咽頭期嚥下は食塊の咽頭への流入による感覚情報が、上喉頭神経内枝や舌咽神経を介して孤束核に伝えられることで生じる。従って上喉頭神経内枝を電気刺激することで咽頭期嚥下を誘発することが出来る^{6,7)}。

4, 咳

咳は喉頭あるいは気管が刺激された時、異物排出のために行われる気道防御反射の一つであり、主に脳幹に存在する神経ネットワークにより生成および制御されている¹⁰⁾。橋の呼吸中枢も咳制御に貢献しているが¹¹⁾、特に延髄に存在する呼吸ニューロン群による制御は重要である^{9,12,13)}。咳運動は大きな吸気とそれに引き続く一時的な声門閉鎖とその後の爆発的な呼気により構成されており、それぞれ咳におけるinspiratory phase, compressive phase, expulsive phaseと呼ばれている¹⁴⁾。また、咳運動は気管への刺激や上喉頭神経内枝、反回神経を電気刺激することで誘発され、横隔膜、甲状披裂筋、腹筋の特徴的な活動パターンとして記録される。

喉頭科学における電気生理学研究

喉頭の高機能性とセントラルパターンジェネレーター

通常喉頭は呼吸性活動を示すが、様々な入力により他の振る舞いへシフトするため、喉頭は高機能性を有すると言われている。これは、喉頭が呼吸だけでなく嚥下、咳、くしゃみなどの気道防御反射機能を担い、また進化の過程で発声を獲得したことにより、多彩な運動を行うことからわかる。この高機能性は主に脳幹に存在するセントラルパターンジェネレーター (Central pattern generator, CPG) で制御されている。CPGとは、運動を誘発する入力系から運動パターン生成を行い、そしてその運動を駆動する運動ニューロン群をすべて含む、神経ネットワークのことである。嚥下、咳、発声にはそれぞれのCPGがその生成や制御に重要な役割を担っており、このCPGが呼吸中に駆動されることで、喉頭は呼吸性運動から他の振る舞いに変化するのである。

Fictive models

脳幹の神経ネットワークを解析するためにはニューロンの活動記録が必要である。実際我々がニューロン活動を記録する場合に、細胞外記録であれ細胞内記録であれ微小ガラス電極やタングステン電極などの細い電極を脳幹に刺入し、小さいものでは径10 μmほどのニューロンの活動を記録しなければならない。従って発声や嚥下、咳などの反射により脳が動いてしまうと安定して記録し続けることが困難となる。そのため筋弛緩剤で筋活動を停止させ、安定した記録を可能にしている。この場合、様々な振る舞いを筋活動で確認出来ないため、神経活動パターンをもとに仮想

図1 麻酔下非動化モルモットにおける発声 (A), 嚥下 (B), 咳時 (C) の神経活動。ABD, 腹筋神経; Call site stim, 脳幹発声経路電気刺激; PHR, 横隔神経; RLN, 反回神経; SLN, 上喉頭神経; Trachea stim, 気管刺激。(Sugiyama et al. 2014. Figure 1 より抜粋)

化する必要がある。これがFictive modelである。例えばFictive vocalizationであれば本来発声時には短い吸気の後には輪状甲状筋、腹筋の強い収縮と音声を観察されるが、筋弛緩によりそれらの確認が不可能になるため、それに代わって中脳中心灰白質を電気刺激している状態で短い横隔神経活動と強い上喉頭神経外枝、腹筋神経活動が起こった場合に発声したと定義するのである⁵⁾。この方法を用いて、我々は脳幹のニューロン活動を記録しながら発声、嚥下、咳などの様々な運動時のニューロンの活動変化やその投射経路の解析などを行っている。(図1)

研究結果

嚥下関連ニューロンの投射経路

我々はこれまで嚥下CPGの解明を目的とした研究を行ってきた。その中で、この研究は嚥下CPGを構成する神経ネットワークの一部を示したものである。嚥下CPGは喉頭感覚入力を受ける孤束核のニューロンからパターンを生成し、そして実際に筋活動を駆動する運動ニューロンまでを含む神経ネットワークのことだが、その内、いわゆるSensory-relay neurons (Type 1 swallowing-related neurons (SRNs)) や運動ニューロン (Type 3 SRNs) はそれぞれ嚥下惹起のための感覚入力、嚥下運動駆動のための運動出力機能を有しているが、複雑な嚥下運動を

図2 嚥下関連ニューロンの局在。Aは冠状断切片、B-Dは水平断切片での再構成を示している。丸と三角は嚥下時に発火する嚥下関連ニューロン、そのうち黒は上喉頭神経からの順行性応答のあるニューロン、白はないニューロンを示す。四角は嚥下時に抑制される嚥下関連ニューロンを示す。AP, 最後野; Cu, 楔状核; DMV, 迷走神経背側運動核; Gr, 薄束核; NA, 疑核; s, 孤束; Sp5, 三叉神経脊髄路核; py, 錐体路; 12N, 舌下神経核。(Sugiyama et al. 2011. Figure 2 より抜粋)

制御したり、左右の動きを同期するパターン生成機構は基本的には有していない⁶⁾。このパターン生成は主に interneurons である Type 2 SRNs で行われていると考えられる⁶⁾。この Type 2 SRNs には上喉頭神経からの多シナプス性順行性入力を受けるニューロンも存在するため、上喉頭神経電気刺激による検索とその活動性の解析はこれまでも行われてきた^{6, 15)}。また、Type 3 SRNs である喉頭運動ニューロンやその Premotor neurons (これは Type 2 SRNs に該当する) の嚥下時活動解析も行われてきた^{16, 17)}。しかしながら Type 2 SRNs の投射経路については、これまでほとんど報告が見られていない。そこで我々はこの Type 2 SRNs の活動解析と投射経路について、神経トレーサーを SRN に注入する方法を用いて解析を行った⁷⁾。麻酔下非動化モルモットを用い、嚥下をモニターするために反回神経、迷走神経咽頭枝、舌下神経甲舌骨筋枝の活動を記録し、上喉頭神経電気刺激により嚥下を誘発した。延髄の孤束核周囲から網様体にかけてのニューロンを検索し、嚥下時に活動が変化するニューロン、つまり SRN を確認、その後トレーサーを注入して投射経路を検討した。SRNs は孤束核周囲から網様体にかけて広く存在しており (図 2)、孤束核内の連絡、孤束核と網様体間での連絡、網様体から対側への投射、孤束核や網様体から疑核への投射などが明らかとなった (図 3)。この結果により、これまで提唱

されていた孤束核近傍の Dorsal swallowing group と疑核近傍の Ventral swallowing group による嚥下生成機構や⁸⁾、孤束核から疑核への直接投射による制御仮説¹⁸⁾は嚥下 CPG のすべてを反映しているのではなく、より複雑なネットワークが存在することが明らかになった。

延髄腹側呼吸ニューロン群の発声、嚥下、咳時活動

喉頭運動ニューロンやその Premotor neurons は多機能性を有し呼吸、発声、嚥下、咳などの呼吸性、非呼吸性運動生成に貢献しているが^{16, 17)}、それ以外のニューロンもこれらの運動生成に関与している可能性がある。上述にもあるように、安静呼吸時に呼吸性運動を行っていた喉頭やその他の呼吸筋がその運動パターンを劇的に変化させ、その他の非呼吸性運動へ移行するためには多くの神経ネットワーク構成を変化させる必要があり、その一つに呼吸中枢の変化があると考えられる。そこで我々は rVRG から BötC のニューロンについて呼吸、発声、嚥下、咳時の活動変化を解析した¹³⁾。麻酔下非動化モルモットを用い、これらの運動をモニターするために反回神経、上喉頭神経、腹筋神経、横隔神経活動を記録した。発声は PAG の電気刺激、嚥下は上喉頭神経電気刺激、咳は気管粘膜刺激あるいは反回神経電気刺激で誘発した。BötC には呼吸性ニューロンが多く存在し、rVRG には多くの吸息性ニューロンが存在しており、これまで言われてきた呼吸ニューロンの局在様式に一致していたが¹⁾、その他のタイプのニューロンは吻尾側に広く分布していた。また、これらの呼吸ニューロンは呼吸性活動だけでなく、非呼吸性運動時にもそれぞれのタイプ毎に特有の活動パターンの変化を示した。この結果から rVRG から BötC の呼吸ニューロンが多機能性を有しており、それぞれの非呼吸性運動に同期して呼吸神経ネットワーク構成を変化させることで様々な運動生成に貢献していることが確認された。

ま と め

喉頭科学における電気生理学的なアプローチの基礎から方法、それを用いた研究の一端を示した。喉頭運動制御メカニズム解明は嚥下障害などの障害メカニズムの解明に必須であるが、未だ不明な点が多い。今後のさらなる研究が待たれるところである。

本内容は第 27 回日本喉頭科学会総会・学術講演会、基礎シンポジウム「喉を守る 喉頭・気管領域の研究 UP TO DATE ~若手喉頭科医による最新の知見」にて発表した内容を改編したものである。

本稿において開示すべき利益相反はない。

参 考 文 献

- 1) Bianchi AL, Denavit-Saubié M, Champagnat J : Central control of breathing in mammals : neuronal

図 3 嚥下関連ニューロンネットワークのシェーマを示す。NTS, 孤束核 (d, 背側亜核; dl, 背外側亜核; m, 内側亜核; v, 腹側亜核; vl, 腹外側亜核); NAsc, 疑核 (semicompact formation); RF, 網様体。 (Sugiyama et al. 2011. Figure 12 より抜粋)

- circuitry, membrane properties, and neurotransmitters. *Physiol Rev* 75 : 1-45, 1995.
- 2) Feldman JL, Del Negro CA : Looking for inspiration : new perspectives on respiratory rhythm. *Nature reviews. Neuroscience* 7 : 232-242, 2006.
 - 3) Dutschmann M, Herbert H : The Kölliker-Fuse nucleus gates the postinspiratory phase of the respiratory cycle to control inspiratory off-switch and upper airway resistance in rat. *Eur J Neurosci* 24 : 1071-1084, 2006.
 - 4) Jürgens U : The neural control of vocalization in mammals : a review. *J Voice* 23 : 1-10, 2009.
 - 5) Sugiyama Y, Shiba K, Nakazawa K et al : Brainstem vocalization area in guinea pigs. *Neurosci Res* 66 : 359-365, 2010.
 - 6) Umezaki T, Matsuse T, Shin T : Medullary swallowing-related neurons in the anesthetized cat. *Neuroreport* 9 : 1793-1798, 1998.
 - 7) Sugiyama Y, Shiba K, Nakazawa K et al : Axonal projections of medullary swallowing neurons in guinea pigs. *J Comp Neurol* 519 : 2193-2211, 2011.
 - 8) Jean A : Brain stem control of swallowing: neuronal network and cellular mechanisms. *Physiol Rev* 81 : 929-969, 2001.
 - 9) Sugiyama Y, Shiba K, Mukudai S et al : Role of the retrotrapezoid nucleus/parafacial respiratory group in coughing and swallowing in guinea pigs. *J Neurophysiol* 114 : 1792-1805, 2015.
 - 10) Shannon R, Baekey DM, Morris KF et al : Functional connectivity among ventrolateral medullary respiratory neurones and responses during fictive cough in the cat. *J Physiol* 525 Pt 1 : 207-224, 2000.
 - 11) Poliaček I, Stransky A, Szereda-Przestaszewska M et al : Cough and laryngeal muscle discharges in brainstem lesioned anaesthetized cats. *Physiol Res* 54 : 645-654, 2005.
 - 12) Shannon R, Baekey DM, Morris KF et al : Ventrolateral medullary respiratory network and a model of cough motor pattern generation. *J Appl Physiol (Bethesda, Md. : 1985)* 84 : 2020-2035, 1998.
 - 13) Sugiyama Y, Shiba K, Mukudai S et al : Activity of respiratory neurons in the rostral medulla during vocalization, swallowing, and coughing in guinea pigs. *Neurosci Res* 80 : 17-31, 2014.
 - 14) Korpáš J, Tomori Z : Cough and Other Respiratory Reflexes. Basel, S. Karger, 1979
 - 15) Saito Y, Ezure K, Tanaka I : Swallowing-related activities of respiratory and non-respiratory neurons in the nucleus of solitary tract in the rat. *J Physiol* 540 : 1047-1060, 2002.
 - 16) Shiba K, Nakazawa K, Ono K et al : Multifunctional laryngeal premotor neurons: their activities during breathing, coughing, sneezing, and swallowing. *J Neurosci* 27 : 5156-5162, 2007.
 - 17) Shiba K, Satoh I, Kobayashi N et al : Multifunctional laryngeal motoneurons: an intracellular study in the cat. *J Neurosci* 19 : 2717-2727, 1999.
 - 18) Broussard DL, Lynn RB, Wiedner EB et al : Solitarily premotor neuron projections to the rat esophagus and pharynx: implications for control of swallowing. *Gastroenterology* 114 : 1268-1275, 1998.

別刷請求先 〒602-8566 京都市上京区梶井町 465

京都府立医科大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科学教室
杉山庸一郎