喉頭の自律神経支配

久 育 男・豊 田 健 司・園 田 隆 郎
紀 平 晋 也・宇 野 敏 行
八 木 正 人・村 上 泰

Autonomic Innervation of the Larynx

Yasuo Hisa, Kenji Toyoda, Takao Sonoda, Shinya Kihira,
Toshiyuki Uno, Masato Yagi and Yasushi Murakami

The autonomic innervation of the larynx has been studied by fluorescence histochemistry and immunohistochemistry. In the laryngeal sympathetic nervous system, many problems have been solved using fluorescence histochemistry (Falck-Hillarp method) and immunohistochemistry for tyrosine hydroxylase. There are still many problems to be studied for the laryngeal parasympathetic nervous system. Advantages and disadvantages of the morphological techniques that have been used in this research field including ours were discussed in detail. Sympathetic nerve fibers were identified in the intrinsic laryngeal muscles and mucosa. In the intrinsic muscles, sympathetic nerve fiber running along the muscle fiber was observed. This finding suggests the existence of the direct sympathetic innervation of the intrinsic muscles. Using 5-hydroxydopamine technique, sympathetic innervation of the laryngeal gland was electron-microscopically clarified. Laryngeal nerves were also clarified to contain many sympathetic nerve fibers and the existence of the perivascular sympathetic innervation of the larynx was considered to be negative. CGRP immunoreactivity in the laryngeal autonomic nervous system was also discussed.

Key words : larynx, autonomic nerve, fluorescence histochemistry, histochemistry, immunohistochemistry, neuropeptide

はじめに

自律神経系は、不随意的、反射的調節によって臓器の動きをコントロールし、呼吸、循環、消化、吸収、生殖、分泌など、生命の維持に必須のものであり、喉頭においても重要な役割を担っていると考えられる。しかし、10年前までは喉頭の自律神経支配の詳細に関しては、極めて不確実なものであった。その一例をあげるならば、喉頭内の自律神経線維の確実な同定もされず、またその線維の喉頭への経路すら明らかではなかった。第16回喉頭基礎問題研究会が、約10年前の昭和56年5月に、「喉頭基礎研究の展望」というテーマで開かれた際に、我々は喉頭の自律神経系の形態学的研究上の問題点について報告した¹⁾。これらの問題点が現在までにどのように解決されてきたか、何が現在も問題点として残っているのか、また、新たにどのようなことが問題となってきたかを本論文で明らかにすることにより、今後の本領域における研究の指針としたい。

研究法について

喉頭における交感神経線維はその細胞体を頸部交感神経節に有し、副交感神経線維のそれは喉頭内あるいは喉頭神

経内に有していると考えられる。節前神経の古典的な伝達物質は交感神経、副交感神経の両者ともアセチルコリンであること、節後神経のそれは交感神経系ではノルアドレナリンであり、副交感神経系ではアセチルコリンであることは良く知られているところである(図1)。よって、何らかの方法でこれらの物質を同定する事が、それぞれの神経を同定する事となる。まずこれらの方法について検討したい。10年前には、交感神経の同定には、光顕的に蛍光組織化学法が、その終末の電顕的検索には5-hydroxydopamine (5-OHDA) 法が、すでに確立されていた。一方、副交感神経の同定には、主にAChE染色が光顕的、電顕的に用いられてきたが、本法は間接的な証明であり確実なものとは言えず、中枢神経系においてCholine Acetyltransferase (ChAT) の免疫組織化学的証明がなされ始めており²⁾、この方法を末梢における副交感神経系の同定に用いれば、より正確な結果が得られるであろうと考えられた。

ChATの免疫組織化学法を用いて疑核の運動神経細胞内のAChの同定には成功した³⁾。しかし、喉頭内の副交感神経線維の同定にはいまだ成功していない。よって、本論文では、主に交感神経系の問題点について検討したい。副交感神経系に関しては今後の検討が待たれるところである。

図1 自律神経系の模式図とその古典的神経伝達物質

瞬間凍結
↓
凍結乾燥（-40℃, 5日間）
↓
ホルムアルデヒド処理（80℃, 1時間）
↓
パラフィン真空下浸透（60℃, 1時間）
↓
薄切
↓
検鏡（蛍光顕微鏡）

図2 蛍光組織化学法の実際

図3 Falck-Hillarp法で処理した甲状披裂筋。血管周囲に交感神経線維が蛍光を有した線維として観察される。

1. 蛍光組織化学法

ノルアドレナリンもそれに含まれるカテコラミンの組織化学的な証明として、蛍光組織化学法が用いられてきた。その原理は生体モノアミンやその前駆物質が、ホルムアルデヒドと反応し、乾燥タンパク質を触媒として蛍光を発する物質となる事を利用したものである⁴⁾。蛍光組織化学法

のひとつである Falck-Hillarp 法⁵⁾ の手順を図2に示す。手間と時間とともに特殊な設備を要する。また、満足すべき試料をコンスタントに得ることが非常に困難であるという難点がある。

Falck-Hillarp 法ののちに改良されたものに湿式法^{6, 7)}がある。本法の利点は簡便である事、そして高感度である事だが、その反面、クリオスタット切片やビブラトーム切片を用いるため、薄切標本の作製が困難という欠点がある。いずれの方法を用いるかをその時々に応じて、よく検討する事が大切である。

2. 5-hydroxydopamine (5-OHDA) 法

アミン線維の電顕的証明には 5-hydroxydopamine (5-OHDA) 法が用いられてきた⁸⁾。False transmitter である 5-OHDA が内在性アミンの代わりに入り込むとともに、オスミウム black を有する性質を利用したものである。投与方法に関しては、総頸動脈注入法と喉頭局所内注入法の両者について検討した。局所内注入した後、注入部位から少し離れた部位から試料を作製することによって、良好な結果を得た⁹⁾。

なお、本研究に際し、実験動物としてはイヌをすべての実験で用いた。

10年前の問題点への対応とその結果

では、上記の方法を用いて、10年前の種々の問題点が現在どのような状況にあるかについて述べる。

1. 喉頭内自律神経線維の同定

10年前には、喉頭内自律神経線維の正確な同定が一切なされてなかった。そこで、まず、内喉頭筋を Falck-Hillarp 法で処理した。図3に甲状披裂筋を示すが、血管周囲にノルアドレナリン線維が蛍光を有した線維として観察される。これは世界で初めて確実に同定された喉頭内交感神経線維である。内喉頭筋内の血管周囲には図3のような細動脈レベルも含め、多くの交感神経線維の分布が確認された。Shin et al¹⁰⁾は喉頭の血流調節に交感神経が関与している可能性を報告したが、本研究の結果からも喉頭筋内の血流調節に交感神経が大いに関与していると考えられた。

図4は、声門下粘膜を Falck-Hillarp 法で処理したものである。粘膜上皮内にはノルアドレナリン線維を認めないが、固有層には多くのノルアドレナリン線維が観察された。喉頭腺周囲にも分布しており、交感神経の喉頭腺分泌への関与が示唆された。そこで、先に述べた 5-OHDA 法を用いて、喉頭腺での交感神経線維終末を電顕的に観察した。交感神経終末と考えられる、5-OHDA を取り込み濃染した小胞を含む終末が、喉頭腺周囲の血管以外の腺上皮、筋上皮近辺にも観察された。これらはすべて自由神経終末として観察された。これらから、喉頭腺に対する交感神経支配の存在がほぼ証明できたと考えられた⁸⁾。

次なる問題点は、果たして従来言われているような、内喉頭筋への直接的な交感神経支配^{11, 12)}が存在するのか否かということである。内喉頭筋を Falck-Hillarp 法で処理

図4 Falck-Hillarp 法で処理した声門下粘膜. 粘膜上皮内には交感神経線維を認めないが, 固有層には多く認め(→), 腺周囲にも分布しているのが観察された(▶).

図5 Falck-Hillarp 法で処理した甲状披裂筋. 筋線維に平行して走る交感神経線維が観察される.

すると, 筋線維周囲, あるいは筋に伴走するノルアドレナリン線維がときに観察される(図5). これらのノルアドレナリン線維が筋に直接終末しているか否かは今後更に検討する必要があると考えられる.

2. 喉頭神経における自律神経線維の構成

各喉頭神経に多くの無髄神経線維が含まれていることは

× 結紮

○ 挫滅

図6 神経束内での伝達物質の同定

図7 Falck-Hillarp 法で処理した上喉頭神経内枝. 多くの交感神経線維が散在性に含まれているのが観察される.

良く知られているが^{13~18)}, 確実なる自律神経線維の同定はなされてなかった.

ここで, 神経束内での伝達物質の同定における注意点を述べる. 伝達物質は軸索流に乗って細胞体から末梢に運ばれることが多い. よって, 軸索のある部位で伝達物質を同定するには, 何らかの方法で軸索流を止めることによって, その部位に伝達物質を貯留させることが必要となってくる. 伝達物質を同定したい部位の末梢を結紮する方法と挫滅する方法の両者を試したが, 図6のごとく, 結紮した場合には中枢側に膨化が認められ, 挫滅の方が優れていると考えられた.

そこで, 上喉頭神経内枝, 外枝および下喉頭神経をそれぞれ喉頭入口部において挫滅した後, Falck-Hillarp 法で処理した. 上喉頭神経内枝には大小4, 5本の神経束があ

り、そのすべてに多くのノルアドレナリン線維が散在性に含まれていることが判明した(図7)。また、上喉頭神経外枝にもノルアドレナリン線維が結構含まれているのが観察された。一方、下喉頭神経では前枝に少数のノルアドレナリン線維が認められたものの、主に後枝に多く含まれていることが判明した¹⁹⁾。図8は下喉頭神経後枝で観察された像であるが、これらから、下喉頭神経中に散在していたノルアドレナリン線維が、まず周辺部に集まり、その後、ノルアドレナリン線維だけが束となって、下喉頭神経から分離していくのではないかと考察した。

3. 上、下喉頭動静脈を介する喉頭の自律神経支配の有無
さて、多くの教科書に自律神経線維は上、下喉頭動静脈を介して喉頭に至ると記されている。しかし、その根拠となる点については不明である。一方、前述のごとく各喉頭神経中には多くの交感神経線維が含まれていることが判明した。そこで、上、下喉頭動静脈を保存した後、上喉頭神経内枝、外枝そして下喉頭神経を喉頭入口部で切断し、1週間後に、喉頭を摘出し、Falck-Hillarp 法に供した。

内喉頭筋、喉頭腺に見られたノルアドレナリン線維は消失し、全く観察されなかった。このことから、上、下喉頭動静脈を介した交感神経系の喉頭支配は存在しないと考えられた。すなわち、喉頭への交感神経線維の経路は喉頭神経のみであると考えられる。

その後の新展開

以上のように、10年前には疑問であった多くの事項が解決された。一方、科学の進歩にともない、本領域でも、研究上の新展開が見られる。その一つに、免疫組織化学法の導入がある²⁰⁾。本法の理論と実際は成書を参考にされたい²¹⁾。

1. Tyrosine Hydroxylase に対する免疫組織化学法
免疫組織化学法の自律神経系研究への応用には次のようなものが考えられる。副交感神経系ではアセチルコリンや

図9 Catecholamine の合成

図8 Falck-Hillarp 法で処理した下喉頭神経後枝で観察された二つの異なった像。神経に散在していた交感神経線維がまず、周辺部に集まり(→)、その後、交感神経線維だけが束となって(⇨)、分離していく(⇩)のではないかと考えられる。

前述の Choline Acetyltransferase の、そして交感神経系ではノルアドレナリンや Tyrosine Hydroxylase の免疫組織化学的証明である。実際に、川副ら²²⁾は喉頭における交感神経線維をノルアドレナリンに対する抗体を用いて免疫組織化学的に証明している。ここでは、我々が行っている Tyrosine Hydroxylase (TH) に対する免疫組織化学法について述べる。本法は、ノルアドレナリンも含まれるカテコラミンの律速酵素である TH (図9) に対する抗体を用いて、同酵素の存在を免疫組織化学的に証明することにより、カテコラミンの存在を間接的に証明するものである。喉頭においてこの酵素の存在が証明されれば、それはノルアドレナリンの存在、すなわち交感神経の証明となる訳である。

図10は甲状披裂筋を TH 免疫組織化学法で処理したものである。甲状披裂筋中の血管周囲に Varicosity を有した TH 陽性線維が観察された。図11に喉頭腺を示すが、腺周囲にも Varicosity を有した TH 陽性線維が観察された。

ここで、本法と前述の蛍光組織化学法とを比較すると、いずれもカテコラミンの証明に用いられるわけであるが、

図10 TH 免疫組織化学法で処理した甲状披裂筋。血管周囲に varicosity を有した TH 陽性線維が観察される。

図11 TH 免疫組織化学法で処理した喉頭腺。腺周囲に varicosity を有した TH 陽性線維 (→) が観察される。

図12のごとく TH 免疫組織化学法の方が優れていると考えられる。しかし、蛍光組織化学法にも利点があり、いずれの方法を選択するかを、研究の用途によって考慮することが肝要である。

2. ニューロペプチドに対する免疫組織化学法

免疫組織化学法の発展とともに、最近、各種のニューロペプチドが自律神経系において、神経伝達物質あるいは神経調節物質としての役割を担っていることが明らかになってきた (図13)²³⁾。喉頭においても多くのニューロペプチドの存在がすでに知られている^{24~26)}。これらは主に古典的伝達物質であるノルアドレナリンあるいはアセチルコリンと共存して、神経機能の精巧な調節を行っていると考えられるが、その詳細は現在いまだ不明であり、今後の発展が待たれる。今回は喉頭の自律神経系に存在すると考えられる各種ニューロペプチドのうち、Calcitonin gene-related peptide (CGRP) に限って、その喉頭における分布について述べる (なお、CGRP は喉頭の知覚神経系にも存在するが²⁶⁾、本論文ではこの点については言及しない)。

	蛍光組織化学	THの免疫組織化学法
物質	カテコラミン自身が閉環する。	カテコラミン合成の律速酵素。
手技	繁雑、確実性が低い。退光する。	再現性が高い。DAB反応で永久保存が可能。
感度	低い。	高い (特に線維、終末)。
その他		counter stainingが可能。電顕的検索が可能。

図12 蛍光組織化学と免疫組織化学の比較

図13 最近、各種のニューロペプチドが自律神経系において、古典的神経伝達物質であるノルアドレナリンやアセチルコリンと共存し、神経伝達物質あるいは神経調節物質としての役割を担っていることが明らかになってきた。

図14 CGRP免疫組織化学法で処理された喉頭室粘膜。喉頭腺にも多くのCGRP陽性線維が分布しているのが観察される。

一般に、CGRPは自律神経系では副交感神経節後神経においてAchと共存するといわれている²³⁾。図14は喉頭室粘膜をCGRP免疫組織化学法で処理したものである。喉頭腺にも多くのCGRP陽性線維が分布しているのが観察される。自律神経線維と考えられるCGRP陽性線維はこれ以外に、喉頭粘膜固有層や内喉頭筋内の血管の周囲にも多く観察された。これらの所見より、やはり、CGRPは喉頭においても副交感神経系に関与していると考えられる。

今後の問題点

交感神経系の諸問題については、今まで述べてきたように、末梢に関するかぎりほぼ解決されてきたように思える。しかし、副交感神経系については、その研究手技上の問題もあって多くのことが未解決のままである。よって、今後はこの点を主たる研究対象としていく必要があると思われる。そのためには、まず実験手法を検討しなければならない。何故、ChATの免疫組織化学的証明が中枢で可能であるのに末梢でできないのか。中枢におけるChATと末梢におけるChATの抗原性に何か相違があるのだろうか。今後の検討が待たれる。

もし、どうしてもChATの末梢における証明が不可能であるのなら、アセチルコリンそのものを免疫組織化学的に証明できないだろうか。すでにアセチルコリンの抗体自体はすでに作製されており、また、市販もされている。しかし、ここにひとつ問題がある。それは固定法である。アセチルコリンを固定するのが極めて難しいのは、良く知られているところである。ある物質に対して、いくら良い抗体が得られても、その物質の固定ができなければ、免疫組織化学的にその物質の存在を証明することは不可能である。もしアセチルコリンに対する最適な固定法が見いだされたならば、この分野における研究は飛躍的に発展すると考えられる。

次なる今後の問題点は、やはり、自律神経系における古

典的神経伝達物質であるノルアドレナリンおよびアセチルコリンと他の神経伝達物質あるいは神経調節物質（ニューロペプチド等）との相互作用の詳細なる究明であろう。

古典的神経伝達物質とニューロペプチドの相違点のひとつは生合成の場の違いである。古典的神経伝達物質は細胞体でも合成されるが、神経終末での生合成のほうが多く、その生合成酵素活性は、最終産物である神経伝達物質によりフィードバック調節を受けているという^{27, 28)}。一方、神経ペプチドは細胞体で合成され、軸索流によって神経終末に運ばれてくる。生合成の場が違くと、遊離した後の伝達物質の補充に差が見られるのは明らかである²⁷⁾。また、古典的神経伝達物質に比べ、ニューロペプチドの含量は著しく少ないことから、強い長時間の刺激で、古典的神経伝達物質に比べ容易に減少、枯渇すると考えられる²⁷⁾。このような両者が喉頭の自律神経系において、どのような相互作用を有しているのか、今後、形態学的手法と生理学的手法を連動させることによって、究明していくことが重要であると思われる。

結 語

以上、喉頭の自律神経系に関する形態学的研究における過去10年間の成果と今後の問題点について述べた。多くの疑問点が現在までに明らかとなったが、未だ不明な点も多々あり、今後の本領域での研究の更なる発展が望まれる。

文 献

- 1) 久 育男：喉頭解剖，自律神経。第16回喉頭基礎問題研究会資料：27～29，1981。
- 2) Kimura H et al：The central cholinergic system studied by choline acetyltransferase immunohistochemistry in the cat. *J Comp Neurol* 200：151～201，1981。
- 3) 久 育男ほか：イヌ疑核運動神経細胞のcholine acetyltransferaseに関する免疫組織化学的研究。日耳鼻 91：1648，1988。
- 4) 田中千賀子，吉田信芳：神経伝達物質の組織化学：アミンニューロン。組織細胞化学1980（日本組織細胞化学会編）261～271，学際企画，東京，1980。
- 5) Falck B et al：Fluorescence of catecholamines and related compounds condensed with formaldehyde. *J Histochem Cytochem* 10：348～354，1962。
- 6) Lindvall O & Bjorklund A：The glyoxylic acid fluorescence histochemical method：a detailed account of the methodology for the visualization of central catecholamine neurons. *Histochemistry* 39：97～127，1974。
- 7) Fukui et al：Further confirmation of heterogeneity of the rat striatum：Different mosaic patterns of dopamine fibers after administration

- of Methamphetamine or reserpine. *Brain Res* 382 : 81~86, 1986.
- 8) Tranzer J & Thoenen H : Electron microscopic localization of 5-hydroxydopamine (3,4,5-trihydroxy-phenyl-ethylamine), a new false sympathetic transmitter. *Experientia* 23 : 743~744, 1967.
 - 9) Hisa Y et al : Ultrastructural and fluorescence histochemical studies on the sympathetic innervation of the canine laryngeal glands. *Acta Otolaryngol* 93 : 119~122, 1982.
 - 10) Shin et al : Vasomotor responses to laryngeal nerve stimulation. *Arch Otolaryngol* 91 : 257~261, 1970.
 - 11) Hartenau W & Schwetz F : Beobachtungen nach experimenteller Recurrendurchtrennung bei der Katze. *Arch Ohr-Nas-KehlkHeilk* 169 : 242~245, 1956.
 - 12) Arnold GE : Vocal rehabilitation of paralytic dysphonia. *Arch Otolaryngol* 70 : 444~453, 1959.
 - 13) Lemere F : Innervation of the larynx. I. Innervation of laryngeal muscles. *Am J Anat* 51 : 417~437, 1932.
 - 14) Lemere F : Innervation of the larynx. II. Ramus anastomoticus and ganglion cells of the superior laryngeal nerve. *Anat Rec* 54 : 389~407, 1932.
 - 15) Heinbecker P & O'Leary J : The mammalian vagus nerve. A functional and histological study. *Am J Physiol* 106 : 623~646, 1933.
 - 16) Evans DHL & Murray JG : Histological and functional studies on the fiber composition of the vagus nerve of the rabbit. *J Anat* 88 : 320~337, 1954.
 - 17) Pressman JJ & Kelemen G : Physiology of the larynx. *Physiol Rev* 35 : 506~554, 1955.
 - 18) Gacek RR & Lyon MJ : Fiber composition of the recurrent laryngeal nerve in the cat. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 85 : 460~471, 1976.
 - 19) Hisa Y : Fluorescence histochemical studies of the noradrenergic innervation of the canine larynx. *Acta Anat* 113 : 15~25, 1982.
 - 20) Sternberger LA et al : The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem* 18 : 315~333, 1970.
 - 21) 井端泰彦 : 活性ペプチド及び神経伝達物質の免疫組織化学的検出. 組織細胞化学1986 (日本組織細胞化学会編) 63~77, 学際企画, 東京, 1986.
 - 22) 川副みちるほか : 喉頭におけるノルアドレナリン作動性線維について. 喉頭 1 : 93~95, 1989.
 - 23) 千葉胤道 : 頭部および頸部の自律神経. *JOHNS* 5 : 789~793, 1989.
 - 24) Uddman R et al : Occurrence and distribution of VIP nerves in the nasal mucosa and tracheobronchial wall. *Acta Otolaryngol* 86 : 443~448, 1978.
 - 25) Hisa Y et al : Substance P nerve fibers in the canine larynx by PAP immunohistochemistry. *Acta Otolaryngol* 100 : 128~133, 1985.
 - 26) Hisa Y & Uno T : Neurotransmitters in laryngeal protective function. *Excerpta Medica* (in press).
 - 27) 村松郁延, 藤原元始 : 末梢自律神経系の神経伝達物質. 神経進歩 33 : 216~225, 1989.
 - 28) Morgenroth VA et al : Evidence for involvement of protein kinase in the activation by adenosine 3'5'-monophosphate of brain tyrosine 3-monooxygenase. *J Biol Chem* 250 : 1946~1948, 1975.

別刷請求先 〒602 京都市上京区河原町広小路上ル
京都府立医科大学耳鼻咽喉科学教室

久 育男