除脳ネコ脳幹電気刺激により誘発される 発声時の内喉頭筋と呼吸筋活動の解析

山 中 康 久・和 田 研・遊 座 潤・伊 藤 宏 文
三 橋 敏 雄・持 田 晃・三 浦 巧・鈴 木 晴 彦
金 子 敏 郎

EMG Activities of the Intralaryngeal and Ventilatory Muscles During Electrically Induced Vocalization in Decerebrate Cats

Yasuhisa Yamanaka, Ken Wada, Jun Yuza,
Hirofumi Ito, Toshio Mitsunashi, Akira Mochida,
Takumi Miura, Haruhiko Suzuki and Toshio Kaneko

Vocalization was induced by repetitive electrical stimulation (0.2ms, 25 to 80 μ A, 60 to 100Hz, lasting for 5 to 30 s) delivered to the brainstem (Horsley Clarke coordinates: A 1.5 to P 5.0, L or R 1.5 to 5.5, H -3.0 to -9.0) in unanesthetized precollicular-postmammillary decerebrate cats. During induced vocalization, the activities of both inspiratory (diaphragm) and expiratory (rectus abdominis) muscles were augmented. The stimulation also bilaterally augmented the activities of the abductor (posterior cricoarytenoid) and adductor (thyroarytenoid) muscles of the vocal folds during inspiration and expiration, respectively. The stimulation initiated in either inspiratory or expiratory phase reset the spontaneous respiratory rhythm. Following inspiration due to the activation of the diaphragm and abductor muscle of the vocal cords, expiration with vocalization and inspiration were alternately induced with a newly developed rhythm. This suggested that the tonic electrical stimulation delivered to the higher brainstem can alter rhythm generation of spontaneous respiration. Persistent opening of a T-tube inserted into the trachea decreased respiratory cycle. Although opening of the T-tube during vocalization decreased subglottic pressure, the expiratory phase did not abruptly terminated. It was suggested that the feedback input from the mechanoreceptors in the laryngeal mucosa was less important than the vagal feedback from the alveolar stretch receptors to maintain respiratory cycle during the induced vocalization.

Key words : decerebrate cat, electrical brainstem stimulation, induced vocalization, EMG, respiratory rhythm

は じ め に

安静呼吸においては、呼息時に声門は閉鎖せず、気道は開大しているが、発声時には安静呼吸時とは異なり、呼息時に声門が閉鎖されている。この様に発声に伴って、喉頭運動は呼吸運動と密接に関連して制御されている。呼吸運動に関しては中枢性リズム形成機構が橋・延髄に存在すること¹⁾、また迷走神経を介する求心性入力により、呼吸周期が制御されていることが知られている²⁾。内喉頭筋支配運動ニューロンは延髄の疑核に存在し、その興奮性は呼吸のリズム形成機構からの出力および呼吸に伴う求心性入力によって影響を受けることが明かとなっている³⁻⁶⁾。また喉頭粘膜からの求心性入力によっても、その興奮性が変化することが明かとなっている⁷⁾。

発声に際しては、これら脳幹に存在する神経機構が上位中枢によって協調のとれた制御を受けることが必要である。除脳ネコの脳幹・橋に加えた電気刺激により発声が誘発される⁸⁻¹²⁾。また、発声誘発部位の尾側を破壊することにより吻側に加えた電気刺激の効果がなくなることが報告されている¹²⁾。これらのことは、上位脳幹が、下位脳幹に存在する内喉頭筋と呼吸筋運動を統合する発声に必要な基本的神経機構を制御していることを示唆する。

本研究では、発声における内喉頭筋と呼吸筋運動の上位中枢による制御様式を解明することを目的とした。そのために、無麻酔除脳ネコにおいて上位脳幹の異なる部位に微小電気刺激を加え、発声誘発部位を同定した。次に誘発された発声における内喉頭筋および呼吸筋の筋電図活動、および呼吸周期の変化を安静呼吸時と比較解析した。また、

刺激により誘発された発声に伴う呼吸周期の形成における求心性入力に機能的役割を明かにするために、気管切開を行い声門下圧を変化させ、その効果を解析した。

実験方法

実験にはネコ ($n=6$; 体重2.9~4.5kg) を用い、ハロセン麻酔下に、前頸部皮膚正中に舌骨から胸骨上部まで縦切開を加えた。胸鎖乳突筋、胸骨舌骨筋を左右に偏移させ、喉頭および気管を露出した。第4~7気管輪で気管切開を行い、T-tube (光研社 #3304, O.D. 8.0mm) を挿入し、気管背側を走行する反回神経を損傷せぬように注意を払って、結紮固定した。声門閉鎖筋である甲状披裂筋 (TA)、声門開大筋である後輪状披裂筋 (PCA) と、吸息筋である横隔膜 (DA)、補助吸息筋である腹直筋 (RA) に、筋電図記録用50 μm 双極ステンレスワイヤ電極を刺入した。両側総頸動脈を結紮し、T-tube 気管口を皮膚外に突出させ、術創を縫合した後、上丘前縁と乳頭体後縁を結ぶレベルで除脳した。

脳定位固定装置に除脳ネコを固定し、麻酔から回復後、タングステン微小電極 (直径200 μm , 先端抵抗0.5~1 M Ω) を中脳から橋にかけての網様体腹外側部に刺入し、0.5mm 間隔で発声誘発部位の検索を行った。連続微小電気刺激 (持続0.2ms, 強度25~80 μA , 頻度60~100Hz) を5~30秒間加え、最小閾値で発声を誘発できる部位 (以後、発声誘発部位と表現する) に電極を固定した。実験中の刺激強度は閾値の1.5倍を用い、以後刺激パラメータは変化させなかった。

筋電図は生体用増幅器 (日本光電社 AB-651J) にて増幅し、オシロスコープに表示モニターした。声門下圧の変化はT-tube 気管口を開閉することで行った。そのためにT-tube 気管口にSwan-Ganz カテーテル (Baxter Healthcare 社 model 93A-821H-7.5F) の先端を固定し、先端のバルーンを収縮・膨張させて気管口を開閉し、同時に声門下圧の測定を行った。筋電図、声門下圧、電気刺激のモニターパルスは誘発された発声の音声とともにFM データレコーダー (TEAC 社 MR-30, DC~10kHz) を用いて磁気テープに記録した。off-line 処理により横隔膜筋活動または声門閉鎖筋活動の開始時点を基準にし、呼吸周期を算定した。

実験中、直腸温をモニターし、保温マットおよび赤外線ランプを用いて体温を36~38 $^{\circ}\text{C}$ に保った。End-tidal CO_2 はガスモニター (NEC-SANEI, model 1H21A) を用いてモニターし、0.3~0.4vol%に維持されていることを確認した。

実験終了後、刺激電極より20 μA , 20秒間の直流電流を通流し、微小破壊巣を作成した。脳幹を10%ホルマリンで固定し、50 μm 凍結切片を作成し、Nissl 染色後、刺激部位を組織学的に検索した。

実験結果

1. 発声誘発部位の検索

発声誘発部位は橋腹外側部、内側毛帯 (ML) と錐体路 (P) 近傍の脳幹網様体 (RF) に限局していた (図1 A, B)。吻尾側方向には長く広がり、尾側ほど腹内側に位置し、延髄のレベルまで広がっていた (図1 C)。刺激閾値は、橋吻側部に比べて橋尾側部や延髄において高くなる傾向があった。橋吻側の発声誘発部位の背側部で、しばしば刺激により呼吸筋活動の増大のみが誘発された。しかし、内喉頭筋の周期的な筋活動の増大のみが誘発された部位は存在せず、発声誘発時は常に、内喉頭筋と呼吸筋活動の増大は同調して誘発された。刺激中、四肢筋群や軀幹筋の動きはほとんど認められず、刺激による効果は発声に必要な顔面筋、舌筋、舌骨筋群に限局していた。

2. 発声時の内喉頭筋と呼吸筋の筋電図学的解析

図2に、発声誘発部位に加えた電気刺激により誘発された発声時の内喉頭筋および呼吸筋の筋電図を示す。吸息相の途中に開始した電気刺激により、刺激開始後、一過性の吸息の延長とそれに伴う後輪状披裂筋 (PCA) および横隔膜 (DA) の筋活動の増加が認められた。引き続き甲状披裂筋 (TA) および腹直筋 (RA) の筋活動の増加が認められ、発声が誘発された。特に、刺激前には弱い活動し

図1 A : 電気刺激を加えた部位を0.5 mm 間隔の格子で示し、吻側橋において発声を誘発できた部位を異なる前額断面図上に黒丸で示す。B : 6例の動物から得られた最低閾値部位を同一前額断面図 (AP 0レベル) に黒丸で示す。C : A図と異なる動物において、吻側橋から尾側にかけて発声を誘発できた部位を示す。

AQ : aqueduct; IC : inferior colliculus; ML : medial lemniscus; P : pyramidal tract; PAG : periaqueductal gray; RF : reticular formation; RTP : tegmental reticular nucleus; SC : superior colliculus; TB : trapezoid body

か示さなかった声門閉鎖筋である甲状披裂筋活動は、刺激により著しく増大した。また、安静呼吸時の吸息終期から呼息期に認められた横隔膜の弱い筋活動は声門閉鎖筋(TA)と呼吸筋活動の突然の増大により消失した。刺激持続中、吸息と発声が自発呼吸よりも延長した周期で交互に誘発され、刺激停止とともに発声は停止した。

刺激強度および頻度の増加に従い、内喉頭筋と呼吸筋の

図2 発声誘発時の内喉頭筋と呼吸筋の筋電図, および発声の持続時間を示す。発声誘発部位 (AP 0, R4.0, H-4.5) に加えた電気刺激 ($50\mu\text{A}$, 0.2ms , 100Hz , 10s) の持続時間を最下段に黒線で示す。PCA: 後輪状披裂筋; TA: 甲状披裂筋; DA: 横隔膜; RA: 腹直筋

図3 吸息相(A)と呼息相(B)に刺激を開始して、発声を誘発した際の内喉頭筋と呼吸筋の筋電図を示す。刺激の持続時間を最下段に黒線で示す。略称は図2と同様。

筋電図活動の振幅が増大し、誘発された発声の音量も増大する傾向があった。刺激側と反対側の内喉頭筋と呼吸筋の筋電図活動を同時記録した例では、同側と比べて、潜時や振幅に著明な相違は認められなかった。

次に刺激中の呼吸周期に着目すると、吸息相に開始した刺激は吸息をある期間継続させ、その後発声を伴う呼息相が開始した(図3A)。刺激強度や動物の差によって、刺激開始直後の吸息相がやや延長する場合もあった(図2)。一方、呼息相に開始した刺激は呼息期間を短縮させ、次の吸息の開始を早め、発声を伴う呼吸周期を誘発した(図3B)。吸息相および呼息相に開始した刺激によって誘発された新しい呼吸周期を比較すると、いずれの場合も刺激開始後ある期間の吸息が持続し、その後一定の周期で呼息相と吸息相が繰り返し誘発された。すなわち、脳幹に加えた電気刺激は呼吸周期をリセットし、吸息から始まる新しい呼吸周期を誘発するとともに、発声に必要な内喉頭筋と呼吸筋の筋活動の増大を誘発することが明かであった。

3. 誘発された発声に声門下圧変化が及ぼす効果

発声を誘発した場合(図4A)とT-tube 気管口を開いて声門下圧の上昇を抑制した場合(図4B)では、刺激前には弱い活動しか示さなかった声門閉鎖筋(TA)筋活動は、刺激により著しく増大した。また、安静呼吸時の吸息終期から呼息期に認められた横隔膜(DA)の弱い筋活動は声門閉鎖筋筋活動の突然の開始と共に消失した。しかし、刺激中の呼吸周期は著しく短縮した。

次に、発声中にT-tube 気管口を開口し、声門下圧の上昇を抑制し、声門下圧の変化が呼吸周期におよぼす影響を解析した。発声を伴う呼息相の途中(図5矢印、呼息開始0.44秒後)でT-tube 気管口を閉鎖した状態から開口した場合には、声門下圧の急激な減少が起こり、発声は停止した。しかし、呼息は急激に終了することなく、ある期間の呼息(図5矢印から呼息終了まで1.24秒)が持続した後、吸息が開始した。この声門下圧の減少後に継続する呼息期

図4 気管切開が発声誘発時の呼吸周期に及ぼす効果。同一の動物において、T-tube 気管口を閉鎖した場合(A)および、T-tube 気管口を開口した場合(B)の内喉頭筋と呼吸筋の筋電図, および発声の持続時間を示す。刺激の持続時間を最下段に黒線で示す。略称は図2と同様。

図5 発声中における声門下圧変化の効果。内喉頭筋と呼吸筋の筋電図、および声門下圧の記録を示す。刺激は全期間加えられている。矢印は、発声を伴う呼吸相の途中で T-tube 気管口を閉鎖した状態から開口したことを示す。SP：声門下圧。他の略称は図2と同様。

間の長さは、T-tube 気管口を開口するタイミングに依って変化した。呼吸相の早期に開口するほど、継続する呼吸期間は延長した。図5において、呼吸開始から矢印までの呼吸期間（0.44秒）を T-tube 気管口を閉鎖した状態の呼吸期間（3.6秒）を100%として標準化したものに、矢印から呼吸終了までの呼吸期間（1.24秒）を T-tube 気管口を開口した状態の呼吸期間（1.36秒）を100%として標準化したものを加算すると、103%であった。同一の動物において繰り返し行った異なる試行のいずれの場合にも、その和はほぼ100%に近い値を示した。（ $99.4 \pm 9.31\%$ ； $n = 6$ ）

一方、発声を伴う呼吸相の途中で T-tube 気管口を閉鎖した場合には、呼吸相の延長は著明ではなかった。また、呼吸相の途中で開口した場合にも同様に呼吸周期の変化は認められなかった。

考 察

上位脳幹に持続性に加えた電気刺激によって、内喉頭筋と呼吸筋の周期的な活動を伴う発声が誘発された。これは、上位脳幹を含んだ上位の中枢神経機構が、下位脳幹に存在する内喉頭筋と呼吸筋運動に必要な基本的神経機構を統合し、発声を発現していることを示唆する。発声誘発部位が延髄レベルまで吻尾側方向に長く広がっていたことや、発声誘発部位の尾側における破壊実験や順行性標識物質等を用いた解剖学的研究から¹²⁻¹⁴⁾、発声誘発部位は内喉頭筋支配運動ニューロンや呼吸中枢の存在する下位脳幹への下行性経路である可能性が示唆される。

発声誘発時、内喉頭筋と呼吸筋活動の増大が認められた。この活動の増大は気管切開によって引き起こされた声門下圧変化による求心性入力の有無に関わらず誘発された。このことは、上位脳幹から下位脳幹に存在する内喉頭筋と呼吸筋運動を制御する神経機構へ、興奮性効果が及ぼされていることを示唆する。橋吻側の発声誘発部位の背側部で、しばしば刺激により呼吸筋活動の増大のみが誘発された。しかし、内喉頭筋の周期的な筋活動の増大のみが誘発された部位は存在せず、発声誘発時は常に、内喉頭筋と呼吸筋活動の増大は同調して誘発された。このことは、下行性

経路の一部が呼吸中枢を制御している経路と重複している可能性を示唆する。上位脳幹からの興奮性入力の下位脳幹の内喉頭筋と呼吸筋運動を同一の経路を介して統合している可能性が推測されるが、異なる経路で興奮性効果をもたらしている可能性も否定できない。

安静呼吸時の声帯運動に関しては、吸息時の声門開大筋活動の開始は横隔膜筋活動の開始に先行することが知られている^{15, 16)}。しかし、発声誘発時には声門開大筋活動の開始の先行は認められなかった。また、安静呼吸時の吸息終期から呼息期に認められた横隔膜の筋活動は声門閉鎖筋と呼息筋活動の突然の開始と共に消失した。これらの安静呼吸時とは異なる筋活動様式は、気管切開によって求心性入力を遮断しても認められた。このことは、発声誘発部位に加えた上位の電気刺激は、安静呼吸時とは異なる様式で、下位の内喉頭筋と呼吸筋を制御する中枢神経機構の活動を惹起したことを示唆する。

安静時の呼吸周期は迷走神経を介する求心性入力により制御されていること、内喉頭筋支配運動ニューロンの興奮性は呼吸に伴う求心性入力や喉頭粘膜からの上喉頭神経内枝由来による求心性入力によって影響を受けることが知られている^{2-5, 7)}。また、安静呼吸時の呼吸流量は求心性入力により積極的に制御されており、呼息時における突然の気管切開は、急速な呼気流出による肺の虚脱を防ぐために、迷走神経由来の求心性入力によって呼吸筋活動を誘発することが報告されている⁶⁾。

本研究においては、上位脳幹に加えた電気刺激を呼吸周期のいずれの位相に開始しても、吸息から始まる新しい呼吸周期が誘発された。誘発された新しい呼吸周期は、声門下圧上昇を抑制することによって短縮した。この求心性入力の変化による呼吸周期短縮の原因としていくつかの可能性が考えられる。第1に、気管切開を行ったことにより声門下圧が低下し、喉頭粘膜や上気道からの求心性入力が増加した。この求心性入力の減少により、発声の中枢神経機構が影響を受け、呼吸周期が短縮した可能性がある。しかし、発声の際での声門下圧の急激な減少にもかかわらず、呼息から吸息への急激な移行が起こらなかったことから、喉頭粘膜や上気道からの求心性入力は余り重要ではないことが推測される。第2に、気管切開を行ったことにより気道抵抗が減少し、流速が速まったために、肺の膨張・収縮時間が短縮した。さらに、肺の膨張時間の短縮は、肺の伸展・閉塞に関連した胸郭や肺胞の受容器からの迷走神経由来による求心性入力の増加を惹起し、次に起こる呼息開始を早めた可能性がある。実際の呼吸流量を計測してはいなかったが、標準化した呼吸期間はほぼ一定であることから、発声誘発時の呼吸周期を形成するための因子として、肺の伸展・閉塞に関連した胸郭や肺胞の受容器からの迷走神経由来による求心性入力が必要であることが示唆される。また、刺激開始直後から呼吸周期短縮が認められるので、発声に伴う過呼吸による低炭酸ガス状態は原因因子として可能性が低いと考えられる。

ま と め

1. 無麻酔除脳ネコの上位脳幹に持続性に加えた微小電気刺激によって、発声を伴う内喉頭筋と呼吸筋の周期的な活動が誘発された。
2. 発声誘発部位は橋腹外側部の脳幹網様体から延髄レベルまで吻尾側方向に長く広がっており、上位脳幹を含んだ上位の中樞神経機構が、下位脳幹に存在する内喉頭筋と呼吸筋運動を統合する基本的神経機構を制御していることが示唆された。
3. 発声誘発時に認められた内喉頭筋と呼吸筋活動の振幅や活動様式は、安静呼吸時とは異なっていた。
4. 上位脳幹に加えた電気刺激を呼吸周期のいずれの位相に開始しても、吸息から始まる新しい呼吸周期が誘発された。
5. 誘発された発声時の呼吸周期を形成するための因子として、肺の伸展・閉塞に関連した胸郭や肺胞の受容器からの迷走神経由来による求心性入力が必要であることが示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本実験の場を提供戴き、終始御指導、御助言を戴きました千葉大学医学部第一生理学教室中島祥夫教授、坂本尚志助教授に厚く御礼申し上げます。

本論文の要旨は、第4回日本喉頭科学会において発表された。

参 考 文 献

- 1) Euler CV : Brain stem mechanisms for generation and control of breathing pattern. Handbook of Physiology, (Cherniack NS and Widdicombe JG ed), sect. 3, vol II, 1~67, Am. Physiol. Soc., Washington, 1986.
- 2) Knox CK : Characteristics of inflation and deflation reflexes during expiration in the cat. J Neurophysiol 36 : 284~295, 1973.
- 3) Bartlett D Jr et al : laryngeal regulation of respiratory airflow. Resp physiol 18 : 194~204, 1973.
- 4) Bartlett D Jr : Upper airway motor systems. Handbook of Physiology, (Cherniack NS and Widdicombe JG ed), sect. 3, vol II, 223~245, Am. Physiol. Soc., Washington, 1986.
- 5) Mead J and Agostoni E : Dynamics of breathing. Handbook of Physiology, (Fenn VO and Rahn H ed), sect. 3, vol I, 411~427, Am. Physiol. Soc., Washington, 1964.
- 6) Remmers JE and Bartlett DJ : Reflex control of expiratory airflow and duration. Exercise Physiol 42 : 80~87, 1977.
- 7) Widdicombe JG : Reflexes from the upper respiratory tract. Handbook of Physiology, (Cherniack NS and Widdicombe JG ed), sect. 3, vol II, 363~394, Am. Physiol. Soc., Washington, 1986.
- 8) Yamanaka Y and Sakamoto T : Effects of tracheostomy upon vocalization induced by midbrain electrical stimulation in decerebrate cats. Neurosci Res Suppl 16 : 106, 1991.
- 9) Yamanaka Y et al : Functional role of afferent inputs in electrically induced vocalization in decerebrate cats. Jpn J Physiol : 1992 in press.
- 10) de Lanerolle NC : A pontine call site in the domestic cat : Behavior and neural pathways. Neurosci 37 : 201~214, 1990.
- 11) Magoun HW et al : Associated facial, vocal and respiratory components of emotional expression : an experimental study. J Neuro Psychopathol 17 : 241~255, 1937.
- 12) Kanai T and Wang SC : Localization of the central vocalization mechanism in the brainstem of the cat. Exp Neurol 6 : 426~434, 1962.
- 13) Jurgens U and Pratt R : The cingular vocalization pathway in the squirrel monkey. Exp Brain Res 34 : 499~510, 1979.
- 14) Holstege G : Anatomical study of the final common pathway for vocalization in the cat. J Comp Neurol 284 : 242~252, 1989.
- 15) England SJ et al : Influence of human vocal cord movements on airflow and resistance in eupnea. J Appl Physiol 52 : 773~779, 1982.
- 16) St John WM et al : Brainstem genesis of automatic ventilatory patterns independent of spinal mechanisms. J Appl Physiol 51 : 204~210, 1981.

別刷請求先 〒260 千葉市中央区亥鼻1丁目8-1

千葉大学医学部耳鼻咽喉科学教室 山中康久