

AMCoR

Asahikawa Medical College Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

喉頭 (1996.06) 8巻1号:4~10.

中心灰白質発声誘発部位からの下行性線維の解剖学的検討

片田彰博, 小林吉史, 杉本俊彦, 坂本尚志

中心灰白質発声誘発部位からの下行性線維の解剖学的検討

片田 彰博¹⁾・小林 吉史¹⁾・杉本 俊彦²⁾・坂本 尚志³⁾

Anatomical Studies on Descending Pathway for Vocalization from the Periaqueductal Gray in Cats

Akihiro Katada¹⁾, Yoshifumi Kobayashi¹⁾, Toshihiko Sugimoto²⁾
and Takashi Sakamoto³⁾

Repetitive electrical stimulation to the midbrain periaqueductal gray (PAG) and the ventrolateral pons (pontine call site: PCS) reported to evoke natural sounding vocalization in cats. The purpose of the present study was to investigate the descending pathways for vocalization from PAG to the lower brainstem. By means of the electrode which could be used for both microstimulation and microinjection, an anterograde tracer, Phaseolus vulgaris leucoagglutinin (PHA-L), was injected at the site of the ventrolateral PAG where vocalization was induced by electrical stimulation.

At the level of caudal superior colliculus, most labelled fibers were sparsely distributed, and they passed laterally through the dorsal part of the midbrain tegmentum. At the level of the inferior colliculus, they could be traced ipsilaterally to the ventral area along the medial lemniscus. They consisted of a narrow bundle in the dorsolateral part of pontine tegmental reticular nucleus. At the level of medulla, they appeared to be concentrated in a discrete area ventrolateral to the inferior olive and dorsal to the pyramidal tract, and their terminals were found in the vicinity of retrofacial nucleus (RFN) and retroambigular nucleus (NRA).

The bundle of the descending fibers in the ventrolateral pons seemed to correspond to the PCS. RFN and NRA where the terminals of these descending fibers were distributed included the respiratory neurons. The projections from PAG to RFN and NRA would be essential for vocalization by modulating respiratory movements.

Key words: PAG, 発声誘発部位, 下行性線維, PHA-L

緒 言

発声運動は呼息時に声門を閉鎖するという運動パターンが基本となっている。除脳ネコにおいて、中脳中心灰白質(PAG)に加えた連続微小電気刺激により、正常発声とほとんど異なる発声運動が誘発される¹⁾ことから、発声運動のパターン形成に関与する基本的中枢神経機構は、中脳以下の脳幹に存在すると考えられている。

ネコのPAG発声誘発部位に加えた連続微小電気刺激は、安静呼吸リズムを中断し、最初に、吸気筋の活動の増大に伴う大きな吸息を引き起こし、それに引き続いて発声と吸息を交互に誘発する²⁾。このとき、呼息時には安静呼吸時に認められた横隔膜筋活動のpostinspiratory activityが消失し、また安静呼吸時には観察されなかった声門閉鎖筋活動の増大が認められる²⁾。このことは、PAGに加えら

れた電気刺激が、横隔膜や内喉頭筋などの活動を制御する延髄呼吸ニューロン群の活動性を変化させ、安静呼吸時とは異なる、発声運動のパターンを形成していることを推測させる。

しかし、PAGに存在する神経細胞の下行性線維の走行、及び、発声時の内喉頭筋と呼吸筋の活動を制御する延髄呼吸ニューロン群への接続様式についての解剖学的な検討は十分になされていない。

本研究では順行性神経標識物質であるPhaseolus vulgaris leucoagglutinin (PHA-L)を用いて、PAG発声誘発部位からの下行性線維の走行および延髄呼吸ニューロン群への投射様式を検討した。

方 法

実験には4頭の成ネコ(2.5kg~3.5kg)を用いた。ネコ

1) 旭川医科大学耳鼻咽喉科学講座

2) 佐賀医科大学耳鼻咽喉科学講座

3) 旭川医科大学生理学第二講座

1) Department of Otolaryngology, Asahikawa Medical College, Asahikawa

2) Department of Otolaryngology, Saga Medical College, Saga

3) Department of Physiology, Asahikawa Medical College, Asahikawa

を塩酸ケタミン (40mg/kg, i.m.) で麻酔し、脳定位固定装置に固定した。頭皮の正中部に約4cmの切開を加え、側頭筋を一部剥離し、頭蓋骨に小孔をあけ、脳の表面を露出した。ガラス管と白金イリジウム線 (直径25 μ m) を貼り合わせた、先端の直径が100 μ m以下の電極をPAG腹外側部に刺入し、持続0.2ms、強度50~150 μ A、頻度100Hzの連続微小電気刺激を2~5秒間加えて発声運動が誘発されることを確認した。その部位に5% PHA-L溶液 (Vector Labs.) を、マイクロシリンジを用いて0.1~0.5 μ l、20~30分かけて圧注入した。注入後、創を縫合して消毒した後、抗生物質を筋注した。術後24時間は、回復室にて経過を観察した。

7日間生存させた後、pentobarbital sodium (40~50mg/kg, i.p.) で麻酔し、経心臓的に脱血液 (0.01M phosphate buffer with saline, pH 7.4, 4 $^{\circ}$ C) 1500mlを用いて脱血し、続いて固定液 (4% paraformaldehyde, 0.2% picric acid and 0.36% glutaldehyde in 0.1M phosphate buffer, pH 7.4, 4 $^{\circ}$ C) 3000mlにて灌流固定した。脳幹を速やかに摘出し2日間、4% paraformaldehyde and 0.2% picric acid in 0.1M phosphate buffer (pH 7.4, 4 $^{\circ}$ C) で後固定した。クライオスタットで両側眼窩下縁と両側内耳孔を結ぶ平面に直交し、両内耳孔を通る平面に平行な面で厚さ50 μ mの脳幹連続切片を作成した。

切片にウサギ抗PHA-L抗体 (5000倍, Vector Labs.) を5日間4 $^{\circ}$ Cで反応させ、次にビオチン化抗ウサギIgG抗体 (1000倍, List Biological Labs.) を12時間、4 $^{\circ}$ Cで反応させた。avidin-biotin conjugated with horseradish peroxidase (ABC complex, Vector Labs.), 0.02% 3,3'-diaminobenzidine (DAB) (Sigma) を用いて可視化した。neutral redで対比染色し、組織標本を作成した。

組織標本は光学顕微鏡を用いて観察し、標識された神経線維の走行、及び神経終末の分布をカメラルシダ法を用いて描画した。

結 果

1) 注入部位

図1に注入部位の写真とすべての動物において注入部位近傍でPHA-Lを取り込んだ細胞の存在した範囲を模式的に示す。PHA-Lを取り込んだ細胞は両側内耳孔のレベルの切片から吻側方向に2.5~1.5mmの範囲に存在し、中脳中心灰白質腹外側部を中心に位置していた (図1B)。PHA-Lを取り込んだ細胞の存在した範囲は0.1 μ lを注入した場合は直径約400 μ m、0.5 μ lを注入した場合は直径約600 μ mであった。

2) PAG 発声誘発部位からの下行性線維の走行

すべての動物において、PHA-Lを取り込んだ神経細胞の下行性線維は大部分が同側の脳幹を下行していた。標識された神経線維の走行は以下の3つの経路に大別された。

第一の経路として、標識された神経線維の大部分が、注入部位であるPAG腹外側部から外側に向かい、中脳網様

体背側部、さらに橋網様体腹外側部へ中脳橋網様体の外側に沿って下行していた。中脳網様体背側部では標識された神経線維は背腹側方向に500~650 μ mの範囲で存在していたが、橋網様体腹外側部では背腹側方向に150~250 μ mの範囲で存在していた。この部位は、標識された神経線維がもっとも狭い範囲に密集して、通過する部位であった。これより尾側の橋のレベルにおいては、橋台形体背側部を、冠状断の切片に対してほぼ垂直に尾側へ下行していた。また、橋台形体尾側部では標識された神経線維の一部が台形体の背側部を正中に向かって走行していた。

さらに尾側の延髄のレベルにおいては、延髄錐体路背外側部を冠状断の切片に対してほぼ垂直に尾側へ下行し、obexから約1.5mm尾側のレベルで錐体路背外側部から、延髄網様体腹側及び外側縁を背外側方向に向かって走り、後疑核の部位に投射していた。また、一部の線維は、橋と延髄の境界のレベルで、上オリブ核及び顔面神経核の内腹側を下行し、後顔面神経核に投射していた。第二の経路として、標識された神経線維の一部は、注入部位であるPAG腹外側部から同側のPAG内の腹側部を尾側に向かって走行し、下丘の尾側部のレベルにおいて下丘下縁に沿って外側へ向かって走り、橋傍小脳脚核腹外側部に投射していた。

また第三の経路として、わずかの神経線維が、注入部位であるPAG腹外側部からPAG内を背側に向かって走り、正中を越え、吻尾側方向に注入部位とほぼ同じレベルの対側のPAG腹外側部に投射する神経線維も観察された (図2)。

以上の傾向はPHA-Lの注入量に関わらず、すべての動物に共通して認められた。

3) PAG 発声誘発部位からの下行性線維の神経終末の分布

下行性線維の大部分が含まれる、延髄の後疑核のレベルまで下行する神経線維の一部は、橋の吻側部のレベルで外側毛帯腹側核の細胞に神経終末を形成していた (図3)。

4頭のうち2頭の動物 (図1Bにおけるcat 1とcat 2) においては、橋台形体尾側部の背側を正中へ向かって走る一部の神経線維の終末が、大縫線核の細胞に認められた。上オリブ核及び顔面神経核の内腹側を下行する一部の神経線維は、後顔面神経核の細胞に神経終末を形成していた (図4A)。最も尾側まで下行する線維は後疑核の細胞に神経終末を形成していた (図4B)。

注入部位から同側PAG内の腹側部を尾側に向かって走行する神経線維は、その一部が注入部位より尾側のPAG腹側部と背側部の細胞に神経終末を形成し、その他の神経線維は橋傍小脳脚核腹外側部の細胞に神経終末を形成していた。

注入部位からPAG内を対側へ向かう神経線維の終末は、吻尾側方向に注入部位とほぼ同じレベルのPAG腹外側部の神経細胞に認められた。

以上のような神経終末の存在部位は、大縫線核を除いて、注入量に関わらず、全ての動物において共通して認められた。

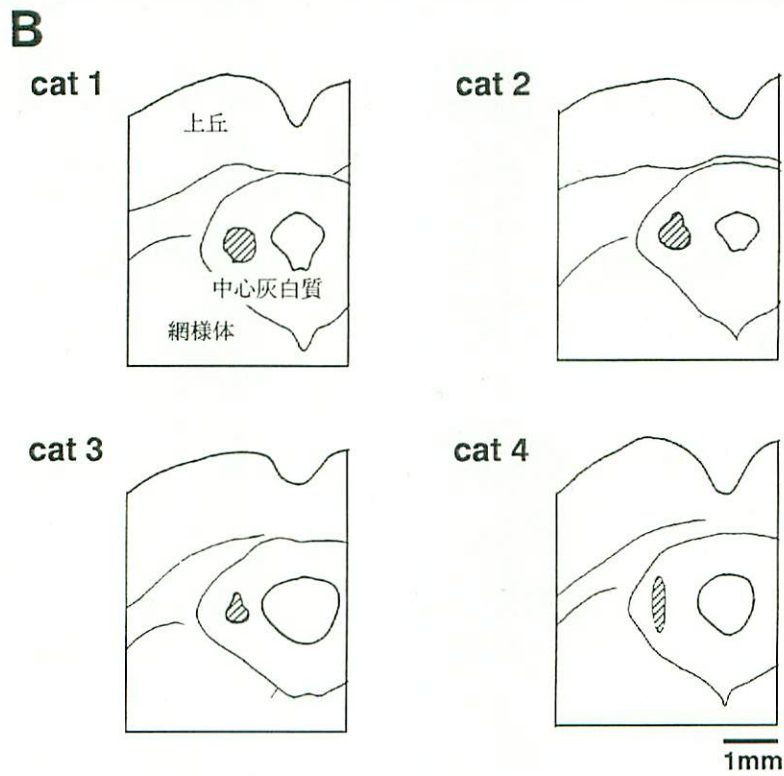
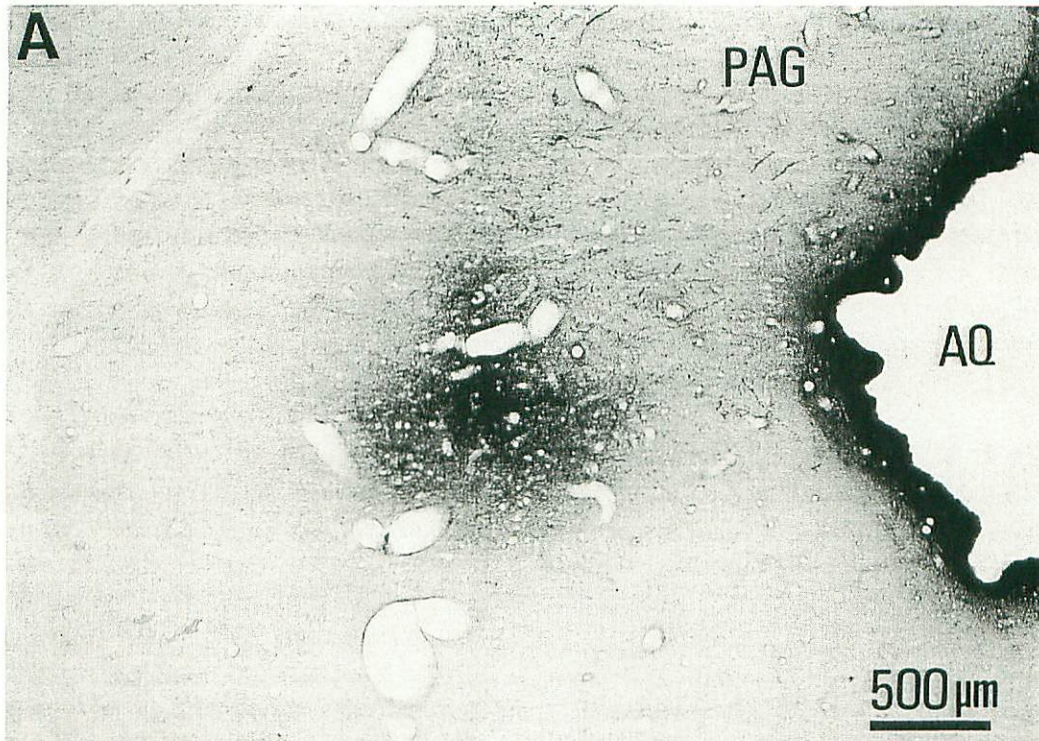


図1 PHA-L 注入部位

A: PHA-L の注入部位. B: 4 頭のネコにおける PHA-L の注入部位を模式図. PHA-L を取り込んだ細胞体の存在した範囲を斜線で示す. すべての動物において注入部位は中心灰白質腹外側部に位置していた. AQ: 中脳水道 PAG: 中心灰白質

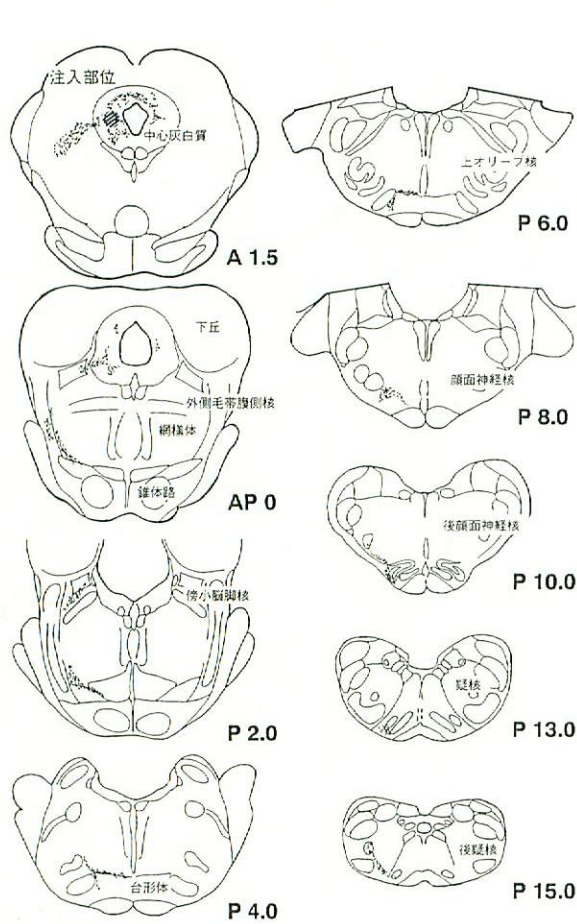


図2 発声誘発部位からの下行性線維の分布
 PHA-Lにより標識された、発声誘発部位からの下行性線維の分布。図1Bのcat 1において得られた結果を示す。脳幹の代表的なレベルにおいて、50 μ mの連続切片5枚から得られた結果を重ねて描画した。注入部位は斜線で示す。数字は両側外耳道の部位における切片からの吻側方向(A)及び尾側方向(P)の距離(mm)を示す。標識された大部分の線維は、PAG腹外側部から外側に向かい、橋網様体腹外側部を通過して延髄後疑核まで下行していた。

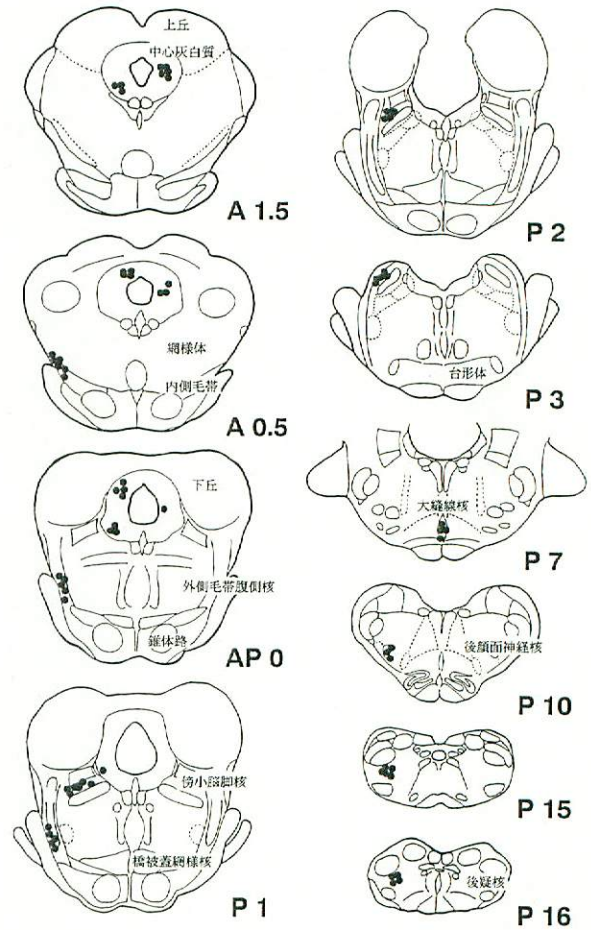


図3 発声誘発部位からの下行性線維の神経終末の分布
 PHA-Lにより標識された、発声誘発部位からの下行性線維の神経終末の付着が認められた神経細胞(●)の分布を示す。図1Bにおけるcat 1において得られた結果を示す。脳幹の代表的なレベルにおいて、50 μ mの連続切片5枚から得られた結果を重ねて描画した。標識された線維の大部分である延髄まで下行する神経線維の終末は後顔面神経核、及び後疑核に認められた。

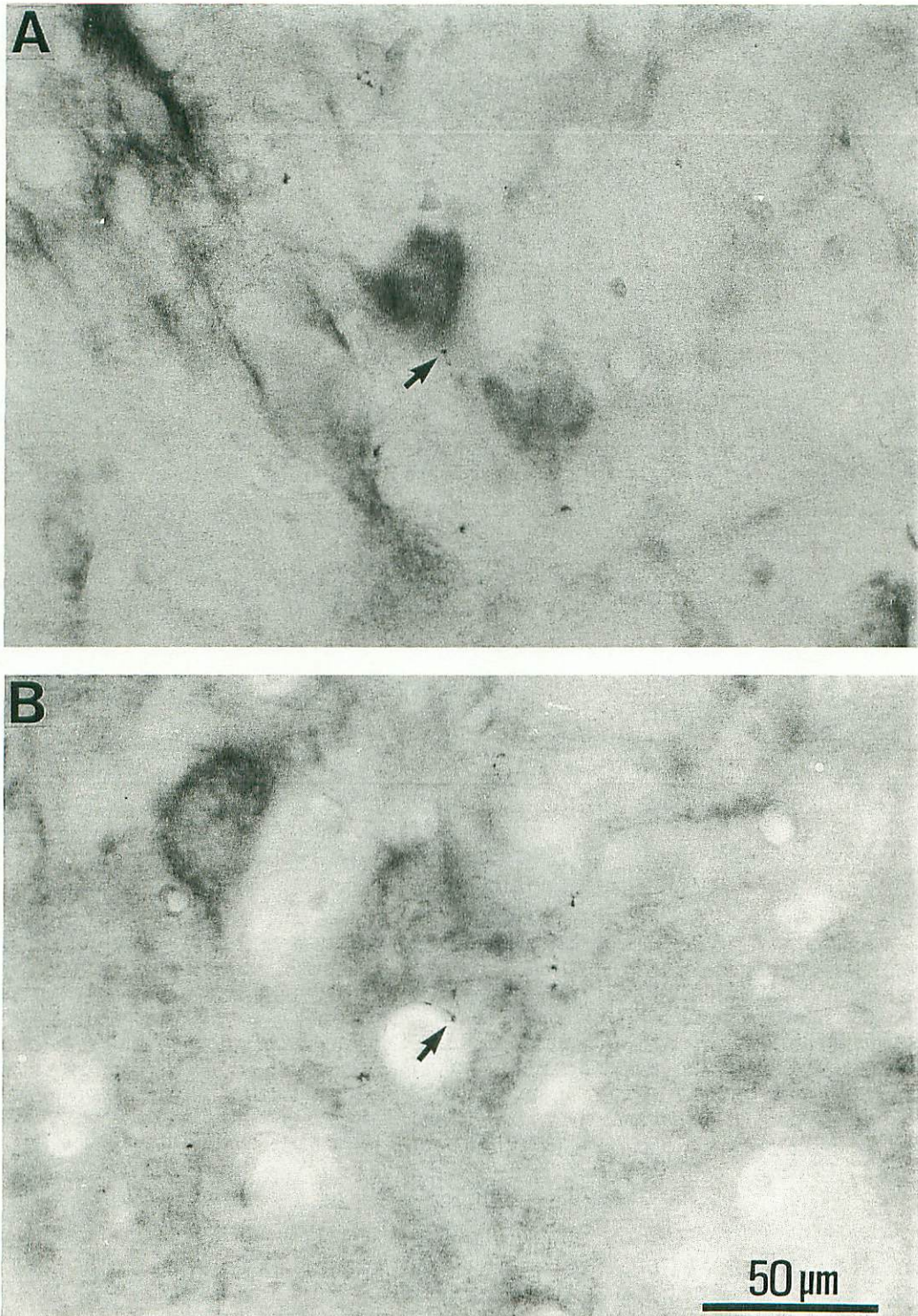


図4 PHA-Lにより標識された、発声誘発部位からの下行性線維の神経終末
後顔面神経核 (A), 及び後疑核 (B) に認められた神経終末. どちらの神経終末もバリコシティを形成
し細胞体に付着していた.

考 察

これまでの研究から、PAGは電気刺激によって異なった種類の鳴き声を誘発できる中枢神経系で最も下位に存在する部位と考えられてきた³⁾。しかしPAGより下位の橋、延髄にも電気刺激によってネコの正常発声と変わらない発声運動を誘発する部位が存在することから、PAGより下位の発声誘発部位において誘発される発声運動は、PAGからの下行性線維に対する刺激によって誘発されている可能性が、発声誘発部位への興奮性アミノ酸の注入実験より示唆されている⁴⁾。

今回の我々の結果から、PAG発声誘発部位に存在する神経細胞の下行性線維の大部分が、中脳網様体背側部、橋網様体腹外側部、橋台形体背側部、を通過し、延髄錐体路背外側部を通過して、延髄後疑核の部位に投射していることが明らかとなった。これらの下行性線維の走行部位はこれまでに報告されているPAGより下位の脳幹における発声誘発部位の分布²⁾と非常によく一致していた。また、これらの下行性線維が最も密に走行していた部位は橋網様体腹外側部であり、この部位は、もっとも弱い電気刺激により発声運動が誘発される部位として知られている²⁾。以上のことから、PAGより下位の脳幹への電気刺激により誘発された発声運動は、PAG発声誘発部位からの下行性線維に対する刺激によるものであると考えられた。

また、PAG発声誘発部位からの下行性線維の一部が、同側のPAG内を尾側に下行し、橋傍小脳脚核背外側部に投射していた。しかし、この下行性線維の通過部位、及び橋傍小脳脚核背外側部は従来報告されている発声誘発部位とは一致していない。内喉頭筋運動ニューロンの存在する延髄疑核に逆行性神経標識物質を注入した実験において、この傍小脳脚核の神経細胞が標識されることが報告されている⁵⁾。よって、PAG発声誘発部位から下行する神経線維は、内喉頭筋運動ニューロンに投射する傍小脳脚核の神経細胞を介して、発声時の内喉頭筋運動ニューロンの活動に影響を及ぼしている可能性があると考えられた。

わずかに標識された対側のPAGに投射する線維は、一側のPAGに加えた電気刺激によって両側性の内喉頭筋及び呼吸筋の協調した発声運動が生じることを考えると、両側のPAG発声誘発部位の神経細胞の同期した興奮性の増大に関与している可能性があると考えられた。

以上の結果をまとめると、標識された神経線維の大部分が含まれるPAGから延髄後疑核まで下行する経路が、呼吸時に声門を閉鎖するという発声の基本運動パターンの発現に関して、最も重要な経路であることが強く示唆された。

前述の、発声運動の基本運動パターンの形成に最も重要と考えられたPAGからの下行性線維は延髄の後疑核、および後顔面神経核に神経終末を形成していた。放射性同位元素を用いた解剖学的研究によって、発声誘発部位であるPAG腹外側部の神経細胞の下行性線維は、発声運動に

重要な内喉頭筋の運動ニューロンの存在する延髄疑核に直接投射するのではなく、延髄後疑核に投射していることが報告されている⁶⁾。今回の結果においても、PAG発声誘発部位からの下行性線維の大部分がobexより約1~1.5mm尾側の後疑核に投射していた。この部位は、従来より報告されている内喉頭筋運動ニューロンの存在部位⁷⁾よりも、約1mm尾側に位置しており、PAG発声誘発部位からの下行性線維は、延髄疑核に存在する内喉頭筋運動ニューロンには、直接投射していないことが推測される。

この後疑核の神経細胞は、発声運動に関与する内喉頭筋、顔面筋、咽頭筋、舌、横隔膜、腹筋などの運動ニューロンへ投射しており、発声運動パターンの形成に関与している可能性があることが報告されている⁶⁾。しかし、今回の結果から、PAG発声誘発部位からの下行性線維は、延髄後疑核だけではなく、延髄後顔面神経核にも投射していることが明らかとなった。

呼吸のリズム形成に直接関与すると考えられている部位は延髄であり、この延髄には、呼吸運動に同期した活動を示す呼吸ニューロンの密に分布する領域が、背内側部と腹外側部に2箇所存在する。この背内側の部位は解剖学的には孤束腹外側核およびその周囲の網様体に相当し、dorsal respiratory group (DRG)と呼ばれている。また延髄腹外側の呼吸ニューロン群は、吻尾側方向に長く3つの部位に細分されており、吻側よりそれぞれBötzinger complex (BÖT), rostral ventral respiratory group (rVRG), caudal ventral respiratory group (cVRG)と呼ばれる。最も吻側に位置するBÖTは、解剖学的には後顔面神経核とその周囲の網様体に相当し、rVRGとcVRGはそれぞれ疑核及び後疑核とその近傍に相当する。このような呼吸ニューロン群の中で、DRGとcVRGの呼吸ニューロンの多くは、延髄内で軸索側枝を出さず、主軸索は対側の脊髄を下行し、単シナプスまたは多シナプス性に横隔膜、また胸部や腹部の呼吸筋の運動ニューロンに投射しているpremotor neuronである。一方、BÖTの呼吸ニューロンは脊髄に投射するものも存在するが、多くは延髄内で豊富な軸索側枝を持ち、DRG、rVRG、cVRGなどの延髄に存在する他の呼吸ニューロン群へ投射している。よってこのBÖTの呼吸ニューロンは、安静呼吸のリズム形成において、他の呼吸ニューロン群の活動を制御し、個々の呼吸ニューロンの活動を同期させることに重要な役割を果たしていると考えられている^{8, 9)}。また、最近の報告では、このBÖTの呼吸ニューロンが、嚥下、咳、嘔吐、などの呼吸筋と内喉頭筋群や咽頭筋群との協調を必要とする運動の発現に関して、安静呼吸時とは異なった特徴的な活動を示すことが知られている^{10, 11)}。

今回の結果からPAG発声誘発部位からの下行性線維が、cVRGの呼吸ニューロンの存在する後疑核だけではなく、BÖTの呼吸ニューロンの存在する後顔面神経核付近も投射していたことは、嚥下、咳、嘔吐、と同様に、BÖTの呼吸ニューロン群の活動の変化が、PAG刺激による発声運

動誘発時の呼吸リズムの変化、及び呼吸筋と内喉頭筋の協調した筋活動パターンの形成に関して、重要な役割を果たしている可能性が示唆された。今後は、BÖT, cVRG の呼吸ニューロンを含めた延髄呼吸ニューロンの、電気生理学的手法を用いた、発声運動中における活動の解析が、発声運動発現に関する中枢神経機構の解明に、非常に重要であると考えられた。

結 語

PAG 発声誘発部位からの下行性線維の大部分は、同側の上丘レベルの中脳被蓋背側部、下丘レベルの内側毛帯腹側部、橋台形体背側部、延髄錐体路背外側部に連続して分布し、その部位は電気刺激によって発声が誘発されると報告されている部位とよく一致していた。その下行性線維の神経終末は、同側延髄において、既に報告されている後疑核付近だけではなく、BÖT の呼吸ニューロンが存在する後顔面神経核にも認められた。PAG 発声誘発部位からの下行線維は、これら 2 つの神経核に存在する神経細胞の活動を変化させることによって、内喉頭筋及び呼吸筋活動を統合し、呼息時に声門を閉鎖するという発声の基本的運動パターンの発現に重要な働きをしている可能性のあることが示唆された。

本論文の要旨は第 7 回日本喉頭科学会（京都，1995 年 3 月）で口演した。

文 献

- 1) 和田 研ほか：ケタミン麻酔ネコの脳幹電気刺激により誘発される発声の解析。喉頭 5：35～40，1993。
- 2) Yamanaka Y et al：Activities of the intralaryngeal muscles during electrically induced vocalization in decerebrate cats. Neuroscience Research 17：77～81，1993。

- 3) Kanai T & Wang SC：Localization of the central vocalization mechanism in the brain stem of the cat. Exp Neurol 6：426～434，1962。
- 4) 和田 研：電気刺激およびグルタミン酸化学刺激を用いたネコ脳幹発声誘発機構の解析。日耳鼻 97：1456～1463，1994。
- 5) 光増高夫：ネコの疑核に投射する神経細胞に関する研究。耳鼻 30：1106～1134，1984。
- 6) Holstege G：Anatomical study of the final common pathway for vocalization in the cat. J Comp Neurol 284：242～252，1989。
- 7) Yoshida Y et al：Arrangement of motoneurons innervating the intrinsic laryngeal muscles of cats as demonstrated by horseradish peroxidase. Acta Otolaryngol Stockh 94：329～334，1982。
- 8) 大竹一嘉，江連和久：呼吸制御回路の形態と機能。神経研究の進歩 36：651～664，1992。
- 9) Ezure K：Synaptic connections between medullary respiratory neurons and considerations on the genesis of respiratory rhythm. Prog Neurobiol 35：429～450，1990。
- 10) Oku K et al：Activity of bullbar respiratory neurons during fictive coughing and swallowing in the decerebrate cat. J Physiol 480：309～324，1994。
- 11) Miller AD & Nonaka S：Bötzing expiratory neurons may inhibit phrenic motoneurons and medullary inspiratory neurons during vomiting. Brain Res 521：352～354，1990。

別刷請求先 〒078 旭川市西神楽 4 線 5 号 3-11

旭川医科大学耳鼻咽喉科学講座 片田彰博