

## 最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 395 号	学位申請者	菅 真有
審査委員	主査	山崎 要一	学位
	副査	佐藤 友昭	副査
	副査	齋藤 充	副査
			博士 (歯学)
			杉浦 剛
			杉村 光隆

主査および副査の5名は、平成28年12月8日、学位申請者 菅 真有 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) 内臓感覚と唾液分泌との関連について過去に報告があったのか。

(回答) 古典的には、Hockman らがネコの迷走神経の胃枝を電気刺激して分泌される顎下腺唾液の滴数を記録した。また、古川らは催吐物質である硫酸銅やアポモルフィンを用いて間接的にイヌの迷走神経を刺激し、顎下腺唾液の滴数を記録した。

質問2) 本研究の新規性は何か。

(回答) 消化管を支配する迷走神経求心性線維の刺激が唾液分泌と嚥下様運動に与える影響を定量的に解析したことである。

質問3) 唾液腺は交感神経と副交感神経両方に支配されているが、それぞれの機能は何か。

(回答) 副交感神経は主に水分・無機成分の分泌、交感神経は主に有機成分の分泌にそれぞれ関与している。

質問4) 交感神経により分泌が促進される有機成分は何か。

(回答) 唾液の粘性を生み出す糖タンパク質のムチンや、デンプンの分解酵素であるアミラーゼなどがある。

質問5) 実験動物として体重300~350gのWistar系ラットを選択した理由は何か。

(回答) Wistar系雄性ラットは、唾液分泌量を測定している過去の同様の研究において広く用いられているため選択した。また、分泌量測定のために、顎下腺導管内へ圧カトランスデューサに接続したカニューレを挿入する必要があり、それに見合う太さに導管が成長していて、かつ老化の影響がないと考えられる10週齢前後の動物を用いた。

質問6) なぜ塩化リチウム (以下 LiCl) 投与の実験と迷走神経求心性線維の電気刺激による実験を、1つの研究計画の中で行う必要があったのか。

(回答) LiClは内臓不快感を惹起する刺激として一般的に用いられている。LiClを投与することで、内臓不快感が唾液分泌を誘発するか否かを確認し、その結果として迷走神経を介して唾液分泌が上昇することが示唆された。その上で、迷走神経求心性線維の活動と唾液分泌の関係を定量的に解析するために、最も効率的な電気刺激法を用いた。

質問7) 麻酔薬としてケタミンを選択した理由は何か。

(回答) 一般的な用量において、循環・呼吸への影響が比較的軽微で、かつ強力な鎮痛作用を有するため。

質問8) ケタミンには自律神経系に対しどのような作用があるか。

(回答) ケタミンはモノアミン輸送体を阻害することから、交感神経系に対しては興奮性に作用する。一方、副交感神経系に対する作用については、興奮性・抑制性双方の報告があり不明な点も多い。

質問9) ケタミンは唾液分泌に何らかの影響を及ぼさなかったのか。

(回答) ケタミンはNMDA型グルタミン酸受容体チャネルを阻害することが知られている。顎下腺の唾液分泌を副交感性に制御している上唾液核細胞において、当該の受容体は興奮性シナプス後電流を担うと報告されていることから、ケタミンは唾液分泌に対し抑制的に作用したと想定された。

質問10) ケタミンとキシラジンそれぞれを単独で投与した実験は行ったのか。

(回答) 行わなかった。

質問11) 筋弛緩薬である臭化ベクロニウムを使用した際に、麻酔深度はどのように確認したか。

(回答) 麻酔深度の判定に足引っ込み反射を用いることができなかつたため、心電図を記録し心拍数の動態から麻酔深度を判断した。

質問12) LiClの腹腔内投与によってラットの行動は変化したのか。変化したのであれば、経時的に違いはあったのか。

(回答) 麻酔下の実験であるため、行動の変化を観察できなかった。

質問13) 覚醒動物にLiClを投与した場合、どのような行動などの変化がみられるのか。

(回答) 過去の報告では、典型症状として腹這いや体温低下が観察されている。

質問14) LiCl投与によって惹起される唾液分泌の量が、投与直後と投与後45~60分で増加しているのに対し、その間の時間帯では対照と大差がなかったのはなぜか。

(回答) 迷走神経求心性線維の活動の記録をみると、LiCl投与直後と、投与後およそ45分以降に発火頻度が上昇し、その間の時間帯では相対的に発火頻度は低くなっており、唾液分泌量の経時変化と一致していた。投与直後の迷走神経求心性線維活動の上昇は、腹腔内注射による主に機械的な一過性の侵襲を反映しており、投与後45分以降のものはLiClによる化学的な刺激作用によるものと考えられた。

## 最終試験の結果の要旨

- 質問 15) LiCl が中枢神経系に対して何らかの作用を及ぼさなかったのか。  
 (回答) Ritter らは、腹腔内投与した LiCl が血行を介して延髄最後野に作用して内臓不快感を誘発することを報告していることから、我々の実験において観察された LiCl の効果には中枢性作用も含まれていたと考えられた。
- 質問 16) 迷走神経求心性線維活動の指標であるスパイク頻度の代表値はどのように計算されたのか。  
 (回答) 各時刻までの累積の平均を求めた。
- 質問 17) Amplitude (振幅) は何を意味しているか。  
 (回答) 本研究では、迷走神経束からマルチユニット神経線維応答記録を行った。記録された電位波形を spike discriminator で処理し、個々の線維が発している活動電位を検出した。グラフで示した amplitude は、その活動電位の振幅の累積平均値である。LiCl 投与から一貫して累積平均値が増加していたことから、活動電位の平均振幅も徐々に拡大したと解釈された。活動電位の振幅は、発火した神経線維の太さを反映していると想定された。つまり、LiCl 投与直後は無髄の細い C 線維が主に発火し、時間の経過に伴って有髄の太い A $\delta$  線維の発火の割合が上昇したと考えられた。
- 質問 18) 迷走神経束の電位波形から検出された活動電位の、増幅前の振幅はどの程度だったか。  
 (回答) 約 30~35  $\mu$ V であった。
- 質問 19) 顎下腺導管とカニューレはどのように接合したのか。唾液の漏れは生じなかったのか。  
 (回答) 導管に縫合糸でテンションをかけて半周切除し、カニューレを挿入後に瞬間接着剤で固定した。さらに歯科用レジンで接合部を被覆し、唾液の漏洩を防止した。瞬間接着剤やレジンには化学的な刺激効果があるが、少量でかつ腺房から十分に離れており影響はほとんどなかったと考えられた。
- 質問 20) 唾液分泌量の測定に圧力トランスデューサを用いていたが、背圧の影響はなかったのか。  
 (回答) 同じ測定機器を用いた過去の報告によると、各記録セッションの直前に、圧力トランスデューサに取り付けたクランプを緩めて内圧を解放することで、13  $\mu$ L までは正確に計測できる。我々の実験で測定・換算された唾液分泌量は最大で約 5.0  $\mu$ L であったことから、背圧の影響はなかったと考えられた。
- 質問 21) 圧力トランスデューサのキャリブレーションはどのように行ったのか。  
 (回答) ラット毎に、圧力トランスデューサのチューブに生理食塩水を満たしたマイクロシリンジを接続し、生理食塩水 1~5  $\mu$ L を注入することで誘発される出力電圧の変化を記録し、容積-電圧関係の校正曲線を得た。
- 質問 22) 頸部迷走神経幹からの記録および刺激を左側で行った理由は何か。  
 (回答) ラットの頸部迷走神経幹は左右で支配領域が異なっている。右側迷走神経幹は心臓に対する支配が強く、電気刺激によって徐脈や心停止などを引き起こし、切断によっても循環動態に変化が生じることで、実験に悪影響を及ぼす可能性が高かったためである。
- 質問 23) 迷走神経幹を電気刺激した時、なぜ刺激部位の末梢側を切断しなければならなかったのか。  
 (回答) 迷走神経には求心性線維と遠心性線維が含まれている。末梢側を切断しなければ、電気刺激により生じた遠心性線維の活動によって支配臓器の機能が変調を受け、結果の解釈が困難となるためである。
- 質問 24) 電気刺激の頻度の範囲を 5~40 Hz に設定した理由は何か。  
 (回答) 予備実験では、およそ 40 Hz で唾液分泌量が頭打ちとなり、より高頻度の刺激ではむしろ分泌量が徐々に低下する傾向がみられたためである。
- 質問 25) 電気刺激に用いたパルスの持続時間はどうであったか。刺激頻度に応じて変化させたのか。  
 (回答) 刺激頻度に依らず 10 ms とした。
- 質問 26) 振幅 5 V のパルスで電気刺激したとあるが、神経線維は損傷しなかったのか。  
 (回答) 神経束の電気刺激に用いられる強度としては一般的なものである。本実験において、迷走神経幹の刺激頻度の上昇に応じ唾液分泌量が増加しており、反復して記録を行っても一貫した結果が得られたことから、神経線維は損傷していなかったと考えられた。
- 質問 27) LiCl を腹腔内投与した実験では、迷走神経求心性線維の発火頻度が投与後約 60 分で 120 Hz を上回っていた例もあったが、その際に誘発された唾液分泌量は 60 分間の積算で数  $\mu$ L に留まっていた。一方、電気刺激の実験では、40 Hz で 10 秒間刺激した際の唾液分泌量が、刺激開始後 60 秒間の積算で 3  $\mu$ L にも達していた。この結果をどのように解釈しているのか。  
 (回答) 本研究で用いたマルチユニット神経線維応答記録法は、電極に接触している複数の神経線維の発火活動を一括して捉えているため、個々の神経線維の発火頻度は結果に示した値よりも遙かに小さい。一方、電気刺激では、個々のパルス毎に神経束に含まれる大部分の線維上に 1 つの活動電位を誘発していたと考えられる。つまり、40 Hz で刺激した場合、ほとんどの線維が 40 Hz で発火していたと推察され、したがって神経束全体での発火活動の頻度は刺激頻度よりも遙かに高く、より多くの唾液が分泌されたと考えられた。
- 質問 28) 筋弛緩薬投与後の記録では、唾液分泌の潜時が延長しているように見える。どのように考えるか。  
 (回答) 筋弛緩薬を投与した複数の例で同様の所見が得られた。この原因として、顎舌骨筋の反復的な収縮により下顎が振動し、舌や口腔粘膜に機械的刺激が加わったことで生じた三叉神経系への感覚入力が増加し、唾液分泌を早めた可能性が考えられた。また、顎下腺腺房部に対する機械的刺激の影響も想定された。
- 質問 29) 嚥下運動と嚥下様運動の違いは何か。  
 (回答) 嚥下運動は顎口腔領域および頸部の複数の筋が異なったタイミングで順次収縮することによって生じる。本研究では、顎舌骨筋の筋電図のみを記録しており、嚥下運動に関わる複数の筋の活動を観察しなかったため、「嚥下様運動」と表現した。
- 質問 30) 歯根膜への機械刺激によって誘発される唾液分泌と、迷走神経求心性線維の刺激によって生じる唾液分泌の神経機構はどう異なるのか。  
 (回答) 迷走神経求心性線維からの情報は、孤束核を介して上唾液核へ入力すると考えられる。一方、歯根膜に加えられた機械刺激の情報は、三叉神経節あるいは三叉神経中脳路核に細胞体を持つ一次感覚ニューロンによって伝えられるが、上唾液核へ至るそれ以降の経路については不明な点が多い。
- 質問 31) 消化管を支配する迷走神経求心性線維の活動による唾液分泌促進には、どのような生理的意義があるか。  
 (回答) 食道の防御作用があると考えられる。例えば、胃食道逆流症などで胃酸が食道へ流入すると、化学的刺激によって食道を支配する迷走神経求心性線維が興奮し、唾液分泌および嚥下運動が誘発される。すると、食道へ流し込まれた唾液によって酸が中和され、食道壁の損傷を抑制することが想定される。
- 以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士(歯学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。