

氏名(本籍)	西島和俊(大阪府)
学位の種類	博士(獣医)
学位記番号	獣医博甲第149号
学位授与年月日	平成16年3月15日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科及び専攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻
研究指導を受けた大学	岐阜大学
学位論文題目	The Afferent Pathway of CO ₂ Reception in the Rat Larynx (ラット喉頭における炭酸ガス受容の求心性経路)
審査委員	主査 岐阜大学 教授 阿閉泰郎 副査 帯広畜産大学 教授 山田純三 副査 岩手大学 教授 谷口和之 副査 東京農工大学 教授 神田尚俊 副査 岐阜大学 教授 武脇義

論文の内容の要旨

喉頭は消化器道と交叉した直後の呼吸器道の入り口に位置し、食塊の誤嚥の回避や呼吸の調節のために密な神経支配を受けている。喉頭を支配する上喉頭神経における電気生理学的研究により、上喉頭神経は喉頭腔内の圧、冷気、水、化学物質、炭酸ガスなどに反応を示す神経線維を含み、また喉頭粘膜には様々な刺激に対する受容器が存在している。炭酸ガスはもっとも有効な呼吸変調刺激であり、血中の炭酸ガス濃度は主に頸動脈小体や大動脈体で監視されている。一方、呼吸気中の炭酸ガスは鼻腔、喉頭、肺で受容され、呼吸調節に影響すると考えられている。喉頭粘膜上皮には刺激受容器として味蕾と自由神経終末が存在し、上喉頭神経内の炭酸ガス反応性神経線維はこれらの内のいずれに由来するものであるかは明らかではない。したがって本研究では喉頭から延髄までの炭酸ガス受容の求心性経路を明らかにするために、特に喉頭粘膜上皮内の味蕾と自由神経終末の炭酸ガス受容への関与についての研究を行った。

1. 喉頭味蕾の形態学的研究

ラットの喉頭味蕾は喉頭蓋の基部、披裂軟骨ヒダ、披裂軟骨小角突起の粘膜に分布していた。電子顕微鏡および免疫組織化学的観察により、味蕾はI、II、III型細胞および基底細胞の4種類からなることが分かった。I型細胞は電子密度が高く細長い細胞で、発達した粗面小胞体やゴルジ装置を有していた。味孔部では味毛を形成しているが、神経との間にシ

ナプスの形成が見られなかったため支持細胞であると考えられた。II 型細胞は電子密度が低く多数の遊離リボソームを含む豊富な細胞質を有し、滑面小胞体やゴルジ装置が発達していた。味孔部では味毛を形成し、神経線維と接する部位に閉鎖膜系を構成していた。III 型細胞はI型とII型の中間の電子密度を示し、核は大きな切れ込みを呈していた。また神経線維と球形の無芯または有芯小胞が集積するシナプスを形成し、喉頭味蕾における知覚受容細胞であると考えられた。味孔部では細胞間にデスモゾームが観察された。基底細胞は味蕾の基底部に位置し、球形の細胞質と核を有していた。免疫組織化学的には味蕾内には protein gene product (PGP) 9.5 やセロトニンに陽性を示す細胞が観察された。味蕾を支配する神経にはカルビンディン D28k に陽性反応を示す比較的太い線維とサブスタンス P や calcitonin gene-related peptide に陽性反応を示す軸索瘤をもつ細い線維が存在した。ラットの喉頭味蕾は構造的に舌の味蕾と類似し、化学受容器として機能すると考えられた。しかしその分布や支配神経の反応性から、味覚ではなく呼吸の調節に関与していると考えられた。

2. 上喉頭神経挫滅ラットの喉頭における炭酸ガス暴露実験

上喉頭神経内には炭酸ガス感受性線維が含まれる。喉頭粘膜上皮には味蕾と自由神経終末の2つの炭酸ガス受容器の候補が存在する。上喉頭神経を外科的に挫滅すると、喉頭粘膜の味蕾は消滅し、自由神経終末は一時的に機能低下に陥る。その後、味蕾の再生と神経の回復が起こる。この再生と回復を観察するために PGP 9.5 に対する免疫組織化学染色を行った。上喉頭神経挫滅後4日までに、味蕾と自由神経終末の PGP 9.5 陽性反応が消滅した。自由神経終末は挫滅後8日目以降、味蕾は16日目以降に PGP 9.5 陽性反応が確認され、40日後には挫滅側の味蕾数は無処置側とほぼ同じにまで再生した。味蕾の再生と自由神経終末の回復には時間的な差が認められ、これを利用することにより喉頭粘膜上皮に自由神経終末は存在するが、味蕾は存在しない状態での炭酸ガスに対する上喉頭神経の反応を記録することができた。この結果、挫滅した上喉頭神経には味蕾再生以前(挫滅後8日~12日間)と以後(挫滅後16日~24日後)に関わらず炭酸ガスに反応を示す神経活動が確認され、喉頭粘膜の自由神経終末は味蕾のあるなしに関わらず、炭酸ガスに反応することが明らかになった。しかし炭酸ガス受容に対する味蕾の関与については明らかにはならなかった。

3. 炭酸脱水酵素と内向き整流カリウムチャネルの喉頭味蕾における分布

炭酸脱水酵素(CA)は炭酸ガスの水解と炭酸イオンの脱水反応を触媒する。CA阻害薬であるアセタゾラミドの適用により上喉頭神経の炭酸ガスに対する反応が減弱されることが知られており、CAは喉頭における炭酸ガス受容に不可欠であると考えられる。一方、細胞膜に存在する内向き整流カリウム(Kir)チャネルは膜電位や細胞の興奮の調整に大きな役割を果たしており、それ自体は細胞内外の要素によって調節されている。これらの要素の一つである水素イオンは特定の Kir チャネルに影響を与える事が知られており、脳幹の神経細胞の炭酸ガス受容に関与していることが示されている。CAのアイソザイム I~III と Kir4.1 の喉頭味蕾での存在を知るために免疫組織化学染色を行った。CAI 陽性反応は喉頭味蕾の細長い細胞に顆粒状に観察された。CAIII 陽性細胞は陰性の核を持ち、細胞質は比較的豊富であった。最も活性の高い CAII は細長い細胞に存在し、同一細胞に Kir4.1 も共存した。また CAII は一部の PGP

9.5 陽性細胞やセロトニン陽性細胞に存在した。PGP 9.5 陽性細胞は味蕾の II 型もしくは III 型細胞であり、セロトニン陽性細胞は III 型であると考えられている。CAII に対する免疫電子顕微鏡による観察では、III 型の特徴である核に大きな切れ込みを持つ細胞が陽性であった。これらの結果により CAII と Kir4.1 は喉頭味蕾の III 型と思われる細胞に存在し、III 型細胞は炭酸ガスを受容していると考えられた。

以上の結果より、ラット喉頭粘膜の味蕾は自由神経終末に加えて炭酸ガス感受性をもつ可能性が示唆された。炭酸ガス感受性神経線維は喉頭腔の圧、化学物質、侵害刺激など異なった刺激に対する反応性や反応様式により複数の型に分けられる。したがって、複数の刺激が炭酸ガス受容メカニズムに関与していると考えられ、この情報が上喉頭神経を介して脳幹に送られると考えられた。

審 査 結 果 の 要 旨

ラットの喉頭粘膜には感覚受容器として味蕾と自由神経終末が存在している。本論文はこれらのうちいずれが炭酸ガス受容に関与するかを知るために電子顕微鏡学、免疫組織化学、電気生理学の研究成果を取りまとめたものである。

ラット喉頭の味蕾は電子顕微鏡および免疫組織化学的観察により、I、II、III型細胞および基底細胞から構成されている。そのうちIII型細胞は味毛と大きな切れ込みを有する核を持ち、神経線維とシナプスを形成していることから感覚受容細胞であることが明らかになった。味蕾内には protein gene product (PGP) 9.5 やセロトニンに陽性を示す細胞が観察された。味蕾を支配する神経にはカルビンディン D28k に陽性反応を示す比較的太い線維と、サブスタンス P や calcitonin gene-related peptide に陽性反応を示す軸索瘤をもつ細い線維が存在した。

上喉頭神経を外科的に挫滅すると喉頭粘膜の味蕾は消滅し、自由神経終末は一時的に機能低下に陥る。その後味蕾は再生し、自由神経終末は経時的に回復する。今回の実験では自由神経終末の PGP9.5 陽性は挫滅後 8 日目以降に回復し、味蕾は 16 日目以降に再生が確認された。この間、喉頭に自由神経終末は存在するが味蕾が存在しない状態での炭酸ガスに対する上喉頭神経の反応を記録することができた。この所見は喉頭に味蕾がない状態でも上喉頭神経内に炭酸ガスに反応を示す線維が存在することを示すものであり、喉頭粘膜の自由神経終末は炭酸ガスに反応することが明らかになった。しかし炭酸ガス受容に対する味蕾の関与については明らかとならなかった。

炭酸脱水酵素(CA)は炭酸ガスの水解と炭酸イオンの脱水反応を触媒し、喉頭における炭酸ガス受容に不可欠であると考えられる。一方、細胞膜に存在する内向き整流カリウム (Kir) チャネルは膜電位や細胞の興奮の調整に大きな役割を果たしており、それ自体は細胞内外の要素によって調節されている。Kir4.1 は水素イオンにより抑制されることが知られており、炭酸ガス受容に関与していると考えられる。光顕免疫組織化学的観察により喉頭味蕾内に CA 陽性細胞が観

察された。最も活性の高いアイソザイム酵素 CAII はセロトニン陽性細胞に存在し、また免疫電子顕微鏡による観察では、III型の特徴を有する細胞が陽性であった。さらに Kir4.1 も CAII 陽性細胞に存在した。

上記のように、本論文は喉頭粘膜の味蕾は自由神経終末に加えて炭酸ガス感受性をもつ可能性を示し、また幾つかの物質が炭酸ガス受容メカニズムに関与していることを示唆した。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値があると認めた。

基礎となる学術論文

- 1) 題 目 : Contribution of free nerve endings in the laryngeal epithelium to CO₂ reception in rats
著 者 名 : Nishijima, K., Tsubone, H. and Atoji, Y.
学術雑誌名 : Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical
巻・号・頁・発行年 : 印刷中

既発表学術論文

- 1) 題 目 : Immunohistochemical localization of carbonic anhydrase isozymes in the rat carotid body
著 者 名 : Yamamoto, Y., Fujimura, M., Nishijima, K., Atoji, Y. and Suzuki, Y.
学術雑誌名 : Journal of Anatomy
巻・号・頁・発行年 : 202(6): 573-577, 2003