

氏名(本(国)籍)	森 永 涼 介 (佐賀県)		
主指導教員氏名	岐阜大学 教授 山 本 欣 郎		
学位の種類	博士(獣医学)		
学位記番号	獣医博甲第520号		
学位授与年月日	平成31年3月13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	岩手大学		
学位論文題目	Serotonergic Circuit for Respiratory Modulation under Hypoxic Exposure (低酸素暴露時の呼吸調節におけるセロトニン作動 性神経回路)		
審査委員	主査	岩手大学 教授	宇塚 雄 次
	副査	帯広畜産大学 教授	北村 延 夫
	副査	岩手大学 教授	山本 欣 郎
	副査	東京農工大学 教授	柴田 秀 史
	副査	岐阜大学 教授	阿閉 泰 郎

学位論文の内容の要旨

延髄腹側呼吸群 (VRC) は延髄腹外側 (VLM) に存在し, Bötzinger complex (BC), pre-Bötzinger complex (PBC), rostral ventral respiratory group (rVRG), caudal ventral respiratory group (cVRG) の領域に分けられ, 相互連絡することで, 呼吸パターンを形成している。本研究では, 低酸素暴露に対する呼吸応答にセロトニン (5-HT) 作動性神経が関与することに注目し, 縫線核 5-HT 作動性神経の VRC への投射を神経標識法により明らかにするとともに孤束核 (NTS) や VRC を含めた延髄全体での低酸素暴露による 5-HT 陽性反応の変化を免疫組織化学的に解析した。

縫線核から VRC 全体への 5-HT 作動性神経の投射を明らかにすることを目的とし, Wistar ラット (雄, 8-9 週齢) の BC, PBC, rVRG 前部, rVRG 後部/cVRG の 4 領域に, 逆行性神経標識物質であるコレラトキシン B サブユニット (CTB) をそれぞれ注入し, 1 週間後に 4%パラホルムアルデヒド (PFA) で灌流固定し, CTB および 5-HT 合成の律速酵素であり 5-HT 作動性神経を標識するトリプトファン水酸化酵素 2 (TPH2) に対する抗体を用いた免疫組織化学により, 縫線核における CTB および TPH2 陽性反応を示す神経を検索した。どの注入例においても, CTB 陽性を示す神経細胞体は吻側縫線核群および尾側縫線核群に広く認めている。CTB 陽性神経の細胞体は円形, 楕円形または多角形であり, 複数の樹状突起を有し, サイズは 67-976 μm^2 であることを示した。また, 縫線核に認められた CTB 陽性神経の一部は TPH2 陽性反応を示し, CTB/TPH2 共陽性神経の細胞体には大型のものが認められないことを示した。大部分の注入例において CTB/TPH2 共陽性神経は, 吻側縫線核群である背側縫線核および尾側縫線核である大縫線核, 巨細胞網様核, 傍巨細胞網様核, 不確縫線核, 淡蒼縫線核に多く認められ, その他の縫線核には少数であ

った。以上の結果から、吻側縫線核群から尾側縫線核群の広い範囲に分布する 5-HT 作動性神経が、VRC 全体に投射していることを明らかにした。

次に、NTS や VRC を含む延髄全体における低酸素暴露による 5-HT 陽性反応の変化を明らかにすることを目的として、Wistar ラットを低酸素ガス (10%O₂) に 1, 2, 4, 6 時間暴露した後、4%PFA で灌流固定し、5-HT に対する抗体を用いて免疫組織化学的検討を行った。また、5-HT 作動性神経と他の神経の関係を明らかにするために、5-HT に加え、PBC の神経に発現するニューロキニン 1 受容体 (NK1R) や A1/C1 および A2/C2 カテコラミン作動性神経を標識するドパミン β 水酸化酵素 (DBH) に対する抗体を用いて多重蛍光免疫染色を行った。低酸素暴露 2 時間群において、吻側縫線核群および尾側縫線核群全体で 5-HT 陽性反応を示す神経細胞体数が非低酸素暴露群より増加した。5-HT 陽性神経線維は延髄の広い範囲に分布し、低酸素暴露 2 時間群の 5-HT 陽性神経線維は非低酸素暴露群と比較し、多く認められた。それぞれの神経核において 5-HT 陽性神経線維の投影面積を非低酸素暴露群と比較したところ、すべての低酸素暴露群の吻側 VLM および低酸素暴露 2, 4, 6 時間群の尾側 VLM において、有意に増加した。また、疑核 (Amb) 緻密部においても、すべての低酸素暴露群で増加傾向があること、低酸素暴露 1, 2 時間群の NTS 外側部や DMX においても有意な増加があることを示した。多重蛍光免疫染色においては、軸索瘤を有する 5-HT 陽性神経線維が、NK1R 陽性神経や DBH 陽性神経の樹状突起や細胞体にそれぞれ接している様子を明らかにした。以上の結果から、低酸素暴露下では、縫線核全域の 5-HT 作動性神経で 5-HT 合成を亢進し、延髄の広い範囲で 5-HT 分泌を亢進することを示唆した。また、5-HT 作動性神経は VRC である PBC の神経を介して直接的に呼吸を調節しているだけでなく、A1/C1 神経などの呼吸に関係する神経を介して間接的に呼吸を調節する可能性を示した。

本研究の結果は、低酸素暴露の際に、吻側縫線核群と尾側縫線核群の両方の 5-HT 作動性神経が低酸素暴露により 5-HT 合成を亢進し、VRC での 5-HT 分泌を亢進することを示している。これらの 5-HT は、VRC の活動を調節して低酸素に対する呼吸応答を生じさせると考えられた。さらに、5-HT 作動性神経は、NTS や交感神経活動を調節する A1/C1 神経、A2/C2 神経、副交感神経活動を調節する Amb や DMX の神経の活動を調節することで、間接的に呼吸を調節している可能性がある。以上の結果は、低酸素暴露時の呼吸調節における 5-HT の重要性を示したものである。

審査結果の要旨

延髄腹側呼吸群 (VRC) は pre-Bötzinger complex (PBC) を中心に呼吸パターンを形成しており、低酸素暴露下では、血中酸素濃度の低下を受容した末梢化学受容体の興奮が孤束核を介して VRC へ伝えられることで、換気量の増加が生じることが知られている。この低酸素暴露に対する呼吸応答に、セロトニン (5-HT) 作動性神経が関与している。5-HT 作動性神経の細胞体は縫線核群に分布しており、5-HT 作動性神経線維は VRC を含めた呼吸に関係する神経が分布する領域に広く存在する。しかし、VRC への 5-HT 作動性神経の投射様式や低酸素暴露下で 5-HT 作動性神経が調節を行う神経核の詳細は明らかでない。そこで、本研究では低酸素暴露下の呼吸調節における 5-HT 作動性神経回路を明らかにするために、神経標識法および免疫組織化学法による解析を行った。

まず、逆行性神経標識物質を用いた解析によって、吻側縫線核群および尾側縫線核群の広い範囲に分布する 5-HT 作動性神経が VRC 全体に投射していることを明らかにした。この結果から、縫線核全体に分布する 5-HT 作動性神経が VRC の神経活動を調節し、直接的に呼吸を変化させると申請者は考察した。5-HT に対する抗体を用いた免疫組織化学

では、低酸素ガス（10%O₂）に暴露したラットの縫線核群全体の 5-HT 陽性神経細胞体や延髄全体に認められる 5-HT 陽性神経線維が、暴露を行っていないラットに比べ、多く認められることを明らかにした。また、軸索瘤を有する 5-HT 陽性神経線維は、PBC の神経や延髄のカテコラミン作動性神経の樹状突起や細胞体にそれぞれ接していることを明らかにした。これらの結果から、低酸素暴露により縫線核全体に分布する 5-HT 作動性神経の 5-HT 合成が亢進し、延髄全体で 5-HT を分泌していると申請者は考察した。また、5-HT 作動性神経は VRC の神経活動を直接調節しているだけでなく、カテコラミン作動性神経などの VRC 以外の神経を介して、間接的に呼吸を調節していると申請者は考察した。

以上の様に、本論文では神経標識法および免疫組織化学法によって、低酸素暴露下における VRC 全体の神経活動の調節に縫線核全体の 5-HT 作動性神経が関与していることを明らかにした。また、5-HT 作動性神経は、VRC だけでなく、VRC 以外の神経の活動を調節することで間接的に呼吸を調節している可能性があることも示した。本研究が新しく提示した低酸素暴露下の呼吸応答における 5-HT 作動性神経の調節回路は、複雑な中枢性呼吸調節回路の解明する上で重要な基礎所見となり得るものである。

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 : Hypoxia-induced increases in serotonin-immunoreactive nerve fibers in the medulla oblongata of the rat
著 者 名 : Morinaga, R., Nakamuta, N. and Yamamoto, Y.
学術雑誌名 : Acta Histochemica
巻・号・頁・発行年 : 118 (8) : 806-817, 2016
- 2) 題 目 : Serotonergic projections to the ventral respiratory column from raphe nuclei in rats
著 者 名 : Morinaga, R., Nakamuta, N. and Yamamoto, Y.
学術雑誌名 : Neuroscience Research
巻・号・頁・発行年 : In Press

既発表学術論文

- 1) 題 目 : Differences in respiratory changes and Fos expression in the ventrolateral medulla of rats exposed to hypoxia, hypercapnia, and hypercapnic hypoxia
著 者 名 : Wakai, J., Takamura, D., Morinaga, R., Nakamuta, N. and Yamamoto, Y.
学術雑誌名 : Respiratory Physiology & Neurobiology
巻・号・頁・発行年 : 215 : 64-72, 2015
- 2) 題 目 : Time-dependent changes in cardiorespiratory functions of anesthetized rats exposed to sustained hypoxia
著 者 名 : Kato, K., Morinaga, R., Fushuku, S., Nakamuta, N. and Yamamoto, Y.
学術雑誌名 : Autonomic Neuroscience : Basic and Clinical
巻・号・頁・発行年 : 212 : 1-9, 2018