

氏名（本籍）	河村 健太（愛知県）
学位の種類	博士（保健医療科学）
学位記番号	博士甲 31 号
学位授与年月日	令和 2 年 3 月 18 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
審査研究科	保健医療科学研究科
学位論文題目	延髄呼息ニューロンの胸髄における軸索側枝の分布様式

学位審査委員

主査	茨城県立医療大学教授	博士（医学）	大瀬 寛高
副査	茨城県立医療大学教授	博士（医学）	河野 豊
副査	茨城県立医療大学准教授	博士（理学療法学）	岩本 浩二
審査員	杏林大学教授	博士（医学）	丹羽 正利

論文の内容の要旨

呼息筋は呼息運動だけではなく、咳嗽や嘔吐、姿勢反射などの重要な機能を持っている。呼息運動は延髄の呼吸中枢に多く存在する下行性主軸索が、脊髄の白質を下行し、灰白質に向けて軸索側枝を伸ばして、灰白質にある胸髄と上部腰髄にある呼息筋支配運動ニューロンに興奮性シナプス結合することで生じる。しかし、呼息ニューロンの胸髄における軸索側枝の分布様式は十分に明らかにされていない。

そこで、本研究では、内肋間筋運動ニューロンが存在する胸髄における呼息ニューロンの下行性主軸索からの軸索側枝の分布様式を、電気生理学的手法を用いて検討した。

本研究は茨城県立医療大学動物実験委員会の承認を得て行った。

実験には成ネコ 6 頭を用いた。麻酔下で大腿動脈と腕頭静脈に血圧測定と薬剤投与のためのカテーテルを留置し、気管切開を行い、人工呼吸管理とした。動物は頭部と腰部を脳定位固定装置に固定し、頭蓋骨尾部を取り除き、延髄背側を露出させ、第 1 頸椎から第 6 頸椎、第 8 胸椎から第 6 腰椎の椎弓切除を行い、硬膜を切開して脊髄を露出させた。単一呼息ニューロンの活動電位は、Fast Green 色素を溶解した 2M NaCl 溶液を充填したガラス管微小電極を用いて細胞外記録した。微小電流刺激は、ガラス管封入タンゲステン微小電極を灰白質に系統的に刺入して行った。軸索側枝を検索するために、脊髄の灰白質を脊髄吻尾方向に沿って電気刺激の試行ごとに 1mm 間隔で尾側から吻側へ移動させ、それぞれの試行は背側から腹側にかけて 100 μ m 間隔で刺入と微小電流刺激を行い、逆行性活動電位の誘発される部位において、誘発に必要な刺激電流の閾値と逆行性活動電位の潜時を計測した。本研究では、側枝の逆行性活動電位の潜時が同じ吻尾方向

の脊髄レベルへの下行性主軸索を刺激した時の潜時より長いこと、下行性主軸索より軸索側枝が分岐する場所と軸索側枝を刺激している部位を活動電位が伝導する時間が0.15msec以上であることの2点を基準にして軸索側枝の同定を行った。

実験終了後、10%ホルマリン溶液で灌流固定し、摘出した脳幹と胸髄の記録部位の連続切片を作成し、呼息ニューロンの記録部位と脊髄の刺激部位を解析し、胸髄における軸索側枝の分布を調べた。

6頭から6例の呼息ニューロンを記録した。6例の呼息ニューロンから18トラックで軸索側枝を同定し、軸索側枝を観察することができたトラックの割合は $20.2 \pm 10.4\%$ であった。また、軸索側枝は吻尾方向に $1.29 \pm 0.59\text{mm}$ の広がりを見せた。タングステン微小電極により逆行性活動電位が誘発された刺激閾値が最も低い箇所は側角から前角にかけての灰白質や白質の境界付近に見られた。本研究では吻尾方向に最大で38mmの広範囲で軸索側枝の分布様式を観察し、先行研究の形態学的検討より広範囲で検討することが可能であった。軸索側枝の分布は上部腰髄の分布と大きく変わらず、呼息ニューロンは胸髄において、内肋間筋支配運動ニューロンへ腹壁筋群支配運動ニューロンと同程度のシナプス結合していることが示唆された。また、軸索側枝が観察されたトラックの一部が灰白質の側角付近に位置したことから、同部位に位置する交感神経節前線維を経由して、呼息ニューロンが自律神経機能の調整に関与している可能性が考えられた。

今後の課題として、本研究における微小刺激電流は、脊髄吻尾方向のみで行ったが、脊髄横断面における軸索側枝の分布様式の解析も必要と思われる。

本研究では、電気生理学的手法を用いることで先行研究に比べて広範囲で軸索側枝の分布を調べることができた。呼息ニューロンは、内肋間筋と腹壁筋の協調運動に重要な役割を担っていることが示唆された。また、呼息ニューロンは仙髄へまで軸索を延ばしていることから、脊髄損傷からの回復過程における呼吸リハビリテーション技術の開発と応用、呼吸と自律機能との関連の解析が期待できると考える。

審査の結果の要旨

本論文の審査は、事前に提出された論文をもとに、2020年2月3日に公開の場における研究発表と質疑応答を行った後、上記の審査員4名により行われた。審査は、本研究科の指針に従い、創造性・新規性、専門領域の関連性とインパクト、論理性、信頼性・妥当性、論文の表現力、倫理的配慮の観点から協議された。以下に、審査の結果を述べる。

創造性・新規性については、実験のプロトコール、呼息ニューロン軸索側枝の分布検出法は、先行研究の手法を踏襲したものであるが、この方法を用いて胸髄を対象に分析を行った報告はないことから、独創的であり、結果を導き出すことができたことは、新規性があると認められた。

専門領域の関連性とインパクトに関しては、胸髄における呼息ニューロン軸索側枝の分布や広がりについて、基礎データが蓄積できたことは評価できる。今後、疾患モデル

との比較研究を行うことで、専門領域の脊髄損傷に対する呼吸リハビリテーション技術の開発や応用につながる可能性があり、インパクトもあると評価された。

論理性も保たれており、序文で呼吸筋、呼吸中枢、軸索側枝などについての知見を総括し、続いて今回の研究目的、方法、結果、考察に至る流れには、理解しやすいものであった。呼吸ニューロンと自律神経系、排尿との関連についての仮説は、大変魅力的ではあるが、今回の実験結果をもとに言及するには根拠が、やや不十分と思われる。今後、さらに研究を進めて解明されることを期待したい。

信頼性・妥当性に関しては、中間審査終了後、さらに2頭のネコの実験が追加され、最終的に6頭での解析となったが、追加した2頭分でも、先の4頭とほぼ同様の結果が得られたことより、実験系の安定性、信用性が確認された。また、先行の4頭での解析が下部胸髄に偏る傾向があったが、追加した2頭については、これまでより上位の胸髄での検討となったことも評価できる。実験終了後、10%ホルマリン溶液で灌流固定し、摘出した脳幹と胸髄の記録部位の連続切片を作成し、呼吸ニューロンの記録部位と脊髄の刺激部位を解析し、胸髄における軸索側枝の分布を確認しており、実験系全般の信頼性も高いと評価される。

論文の表現力については、難解な実験系、実験手法を丁寧に説明し、図表も効果的に使って、理解しやすいように表現が工夫されており、高く評価された。

倫理的配慮に関しては、本学動物実験委員会の承認を得て実施され、倫理的手続きを丁寧に重ねており、十分な配慮がなされたものと認められた。

本研究で得られた結果の解釈は、先行研究が極めて少ないため推察の域を出ないが、基礎データが蓄積され、また、終始、臨床とも関連づけて考察がなされたことは意義深い。今後、脊髄損傷モデルと比較することで、軸索側枝の数や分布の違い、また、それらが呼吸リハビリテーションを行うことでどのように変化するかを検討できれば、呼吸リハビリテーション技術の開発や、呼吸と自律神経との関連の解明につながる可能性があり、研究のさらなる発展が期待される。

以上の協議結果を総括して、審査員全員の合意のもとに、本論文が博士論文として適切であり、博士の学位に相当するという審査結果に至った。