Swallowing reflex is inhibited by orofacial noxious stimulation through ERK phosphorylation in NTS and Pa5 neurons in rats

Takanori Tsujimura[1], Tomoyo Iwakami[1], Mika Fukano[1], Koichiro Ueda[1], and Koichi Iwata[2]

Departments of [1]Dysphagia Rehabilitation and [2]Physiology,
Nihon University School of Dentistry

［Received 25 September 2008, Accepted 15 October 2008］

Abstract

The aim of present study is to clarify neuronal mechanisms of an inhibition of swallowing reflex following capsaicin injection into the whisker pad skin or lingual muscle in anesthetized rats. We analyzed the number of swallows induced by topical administration of 0.1 ml of water to the pharyngeal mucosa following capsaicin injection into the whisker pad skin or lingual muscle. The phosphorylated extracellular signal–regulated kinase (pERK) immunohistochemistry in the medulla and upper cervical spinal cord was also carried out in 10 mM capsaicin–treated rats. We also studied the effect of MAP kinase (MEK)1/2 inhibitor, PD98059, on pERK expression and swallowing reflex following 10 mM capsaicin injection into the whisker pad skin or lingual muscle.

The number of swallows decreased in dose dependent manner following capsaicin injection into the whisker pad skin or lingual muscle. The number of pERK–like immunoreactive (pERK–LI) cells in the nucleus tractus solitarii (NTS), trigeminal spinal subnucleus caudalis (Vc) and paratrigeminal nucleus (Pa5) was significantly larger in the rats with capsaicin treatment compared to vehicle–treated rats. After intrathecal (i.t.) injection of PD98059 in the rats with capsaicin treatment, the number of pERK–LI cells was significantly depressed compared to vehicle–treated rats. Swallowing reflex was significantly enhanced in PD98059–treated rats compared to vehicle–treated rats.

These findings suggest that the ERK phosphorylation in NTS and Pa5 neurons is involved in modulation of swallowing reflex following noxious stimulation of the orofacial regions.

Key words: Swallow; pERK; Trigeminal nerve; Capsaicin; Brain stem neurons

PAIN RESEARCH 24 (2009) 1–8

ラット孤束核および三叉神経傍核ニューロンは口腔顔面領域の侵害刺激による ERK のリン酸化を介して嚥下反射を抑制する

辻村 恭憲[1]／岩上 朋代[1]／深野 美佳[1]／植田 耕一郎[1]／岩田 幸一[2]

[1]日本大学歯学部 摂食機能療法学講座，[2]日本大学歯学部 生理学教室

はじめに

近年，高齢者に発症する深刻な機能障害の1つとして嚥下障害が注目されている[21]。嚥下障害を引き起こす原因として，脳血管障害や口腔顎顔面領域における悪性腫瘍等が挙げられており，三叉神経の感覚・運動障害が嚥下障害に関連していると推察される[16,20]。また，多発性筋炎や抜歯後の深刻な口腔痛によっても嚥下運動が変調されるとの報告がある[5,31]。さらに，ヒツジの舌神経を電気刺激することにより，上喉頭神経電気刺激により誘発された嚥下反射が抑制されたとの報告もあることから，三叉神経侵害入力が嚥下反射の調節に関与していると考えられる[35]。しかしながら，この神経調節機構については全く不明である。そこで本研究では，三叉神経領域の侵害入力による嚥下反射調節機構を行動学的・免疫組織化学的に探索し，その神経機構を解明することを目的とした。

Jean は，嚥下反射の神経機構として末梢入力が舌咽・迷走神経を伝って孤束核（NTS）へ伝達され，その後延髄腹外側部へと運ばれ，運動ニューロンが活性化し嚥下を生じると提唱している[9]。さらに NTS へのグルタミン酸微量注入は嚥下を促進し，同じく NTS への GABA，カテコラミン微量注入は嚥下を抑制することが知られており，嚥下反射の神経機構の中で NTS は中心的役割を果たしていると考えられる[13,14,15,32]。そこで三叉神経領域の侵害刺激後，嚥下反射の変化を筋電図記録により検索し，さらに NTS を含む延髄から上部頚髄領域において活性化ニューロンが分布する部位を同定した。

Ji らは，extracellular signal-regulated kinase（ERK）が侵害刺激後多くのニューロンで5分以内にリン酸化され，さらに MEK1/2 のインヒビターである PD98059 の髄腔内投与が侵害反射の強い抑制を誘発することを報告した[10]。これは ERK のリン酸化が侵害反射に強く関連していることを示している。リン酸化 ERK（pERK）は様々な侵害刺激により活性化されると考えられており，本研究では活性化ニューロンマーカーとして pERK を用い，また PD98059 髄腔内投与による pERK 陽性細胞発現の変化を観察し，さらに PD98059 髄腔内投与により誘導される嚥下反射の変化を探索した。

方　法

この研究は日本大学歯学部実験動物委員会の許可を経て，国際疼痛学会のガイドラインに従って行われた[34]。実験には全部で 60 匹の SD 系雄性のラット（体重 250～350 g）を用いた。

1. カプサイシン注入と嚥下の解析

ラットをウレタン（1.3 g/kg, i.p.）麻酔後，脳定位固定装置に仰向けに固定し，頚部の腹側表面に正中切開を加え，呼吸を維持するために気管カニューレの挿管を行った。蒸留水注入により嚥下反射を誘発するため咽頭部にチューブを設置し，さらに蒸留水を排出するため別のチューブを食道の中に留置した。蒸留水投与のためのインフュージョンチューブ（直径 0.9 mm）をガイドチューブ（直径 2.2 mm）の中で固定した。EMG 記録の5分以上前にインフュージョンチューブの遠心端が軟口蓋の終わりに位置するように，ラバーストッパーでガイドチューブを硬口蓋の正中部に固定した。この方法により機械刺激なしで正確に咽頭喉頭領域を刺激することができると Kajii らが報告している[11]。EMG 活動を記録するために双極エナメルコートステ

ンレススチールワイヤー電極（電極間距離約5 mm）を左側顎舌骨筋に留置した。顎舌骨筋は嚥下に関与する最も重要な筋の一つとみなされていることから，嚥下反射の指標として顎舌骨筋のEMG活動と喉頭運動を記録した[4]。EMG発火頻度を蒸留水注入の間20秒とその後40秒，計1分間記録し，喉頭運動とともに嚥下と同定された回数を計測した。顎舌骨筋EMG活動をパーソナルコンピューターシステムのハードディスクに記録し，オフラインでスパイクⅡ（CED）ソフトウェアを用いてEMG活動を解析した。

また，カプサイシン刺激による嚥下反射への影響を調べるため，カプサイシン（Wako Co. LTD, Japan）を100％エタノールと7％Tween 80とともに生理食塩水で溶解したカプサイシン溶液（1 mMもしくは10 mM），もしくはビークル溶液20 μlを左側口髭部皮下または左側舌筋にそれぞれ注入した。上記処置の6分後，蒸留水を咽頭領域へ注入ポンプを使って1秒間に5.0 μl/sの流速で20秒間注入した。嚥下回数をカプサイシン注入6分後より1分間計測した（口髭部, 舌筋：各n=15）。

2. pERK陽性細胞の免疫組織化学的染色

ラットをペントバルビタールNa（50 mg/kg, i.p.）で麻酔後，左側口髭部皮下もしくは左側舌筋に10 mMカプサイシンもしくはビークルを注入し，6分後に0.9％生理食塩水（50 ml）を灌流後，4％パラフォルムアルデヒド溶液にて潅流固定を行った。延髄と上部頚髄を取り出し，4℃で3日間後固定した後，20％スクロースに48時間浸漬した。厚さ30 μmの凍結連続切片をミクロトームにて作製し，4枚おきに1枚の切片を解析に使用した。切片を0.01 M PBSで洗浄し，10％ normal goat serumを含む0.01 M PBS（triton加）に室温で1時間半，その後rabbit anti phospho-p44/42 MAP Kinase Antibody（1：1000, Cell Signaling Technology, USA）に4℃で72時間浸漬した。0.01 M PBSで洗浄後，biotinylated goat anti-rabbit IgG（1：600, Vector Labs, USA）に室温で2時間浸漬し，再び0.01 M PBSで洗浄後，avidine-biotin-complex（1：100, ABC, Vector Labs, USA）に室温で2時間浸漬した。その後0.05 M Tris Buffer（TB）にて洗浄し，0.035％ 3,3'-diaminobenzidine-tetra HCL（DAB, Sigma Co. LTD, Tokyo），0.2％ nickel ammonium, 0.05％ peroxideを加えた0.05 M TB（pH 7.4）に室温で5分間浸漬した。それから0.01 M PBSで洗浄し，ゼラチンコートスライドに貼り付け，アルコールで脱水後，封入した。pERK陽性細胞は光学顕微鏡下でcamera-lucida（Neurolucida 2000, MicroBrightField Inc, USA）を用いて記録し，pERK陽性細胞数の平均値を算出した（口髭部, 舌筋：各n=10）。

3. PD98059投与

PD98059の髄腔内持続投与による，カプサイシン刺激後のpERK陽性細胞発現の変化，およびカプサイシン刺激後の蒸留水誘発嚥下反射の変化をそれぞれ検索した。10％ジメチルスルホキシドとともに生理食塩水に溶かしたPD98059溶液もしくはビークル溶液をペントバルビタールNa（50 mg/kg, i.p.）麻酔されたラットに投与した。マイクロシリコンチューブ（直径0.8 mm）にAlzet mini-osmotic-pump（model 2001, Durect Co, USA; total volume of the pump: 200 μl, drug infusion: 1 μl/hour for 7 days）を連結した。L1〜L4の脊椎を露出しL2〜L3領域の硬膜を除去後，マイクロシリコンチューブを硬膜下のスペースに挿入した。延髄への機械的な損傷を避けるた

めに先端を C2〜C3 領域の背側に留置し，Alzet mini-osmotic-pump をラットの背部皮下に埋入した（口髭部, 舌筋：各 n=20）。

4. 統計解析

データはすべて平均±標準誤差で示され，統計処理は Sigma Stat3.5（Systat software, USA）を使用した。カプサイシン刺激の嚥下反射への変化については One way ANOVA（post hoc Tukey test）を用い，その他の解析には等分散性と正規性が認められた場合 Student's t-test を，認められなかった場合には Mann-Whitney Rank Sum test を用いた。統計学的有意水準は $p<0.05$ とした。

結　果

1. 口髭部皮下，舌筋へのカプサイシン注入後の嚥下反射の調節

咽頭領域への水投与後，舌筋へのカプサイシン（1, 10 mM）またはビークル注入後に顎舌骨筋より記録された筋活動電位の典型例を **Fig.1** に示した。口髭部へのビークル注入時，嚥下回数は 11.2 ± 1.8 回（n=5），カプサイシン 1 mM 注入では 7.8 ± 1.2 回（n=5），10 mM は 4.6 ± 1.4 回（n=5）を示した。舌筋においてビークル注入時 12.6 ± 1.1 回（n=5），カプサイシン 1 mM は 2.8 ± 0.5 回（n=5），10 mM は 0.4 ± 0.2 回（n=5）を示した。口髭部，舌筋いずれも濃度依存的に嚥下回数の減少を認め，口髭部はビークル群と比較して 10 mM 群で有意に少ない嚥下回数を示したが，舌筋ではさらに低濃度の 1 mM 群においても有意に少ない嚥下回数を示した。

2. カプサイシン刺激後の pERK 陽性細胞数

Fig.2 には口髭部，舌筋に 10 mM カプサイシン注入後の obex 付近における pERK 陽性細胞の分布様式を示した。口髭部においては多くの pERK 陽性細胞が同側三叉神経脊髄路核尾側亜核（Vc）の浅層，および両側 NTS に分布していた。舌においては両側 Vc の浅層，両側 NTS および両側三叉神経傍核（Pa5）に発現していた（**Fig.2**）。口髭部カプサイシン刺激時の Vc における pERK 陽性細胞数は 202.4 ± 28.2（n=5），NTS においては 100.6 ± 14.4（n=5）で，いずれもビークル刺激時の Vc 30 ± 3.3（n=5），NTS 30.8 ± 3.7（n=5）と比較して，それぞれ有意に高い値を示したが，Pa5 においてはカプサイシン

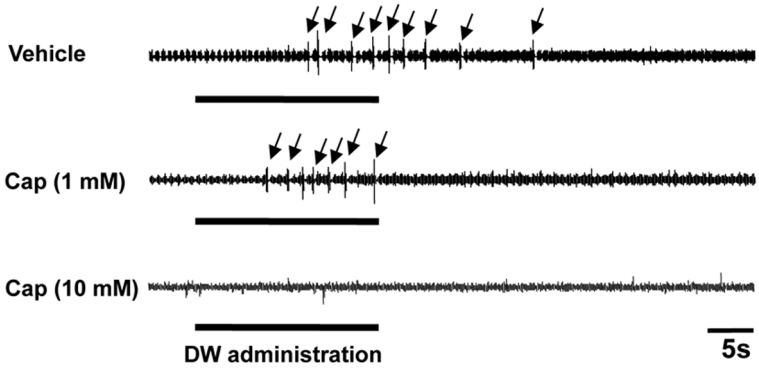


Fig.1 EMG discharges in mylohyoid muscle induced by water administration, which were modulated by capsaicin (1, 10 mM) or vehicle injection into the lingual muscle.

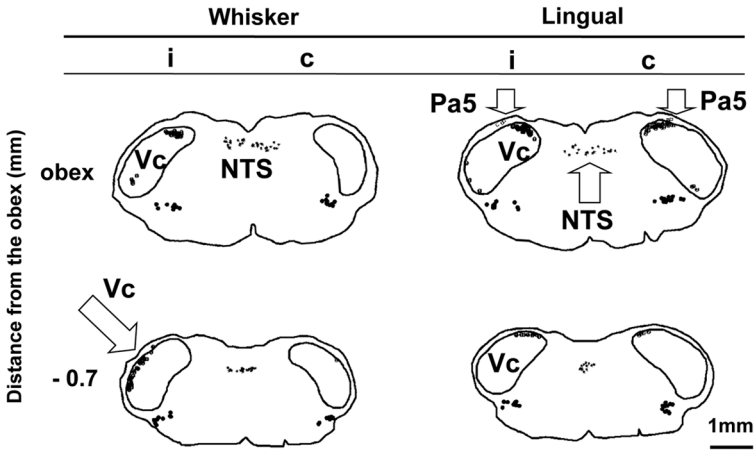


Fig.2 Camera–lucida drawings of pERK–LI cells in the medulla and upper cervical spinal cord following 10 mM capsaicin administration into the whisker pad skin or lingual muscle. Arrows indicate the brain stem regions where a large number of pERK-LI cells is expressed.

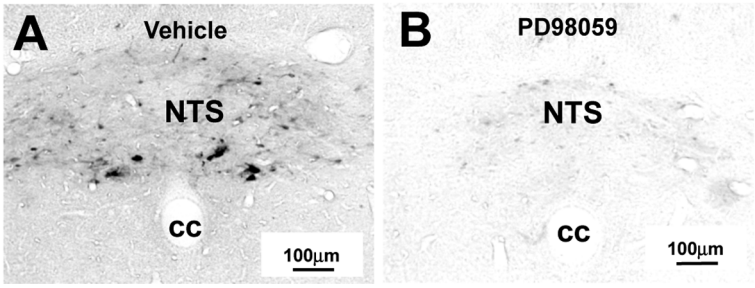


Fig.3 Photomicrographs of the NTS after 10 mM capsaicin injection into lingual muscle (**A:** Vehicle, **B:** PD98059). The number of pERK cells was modulated after PD98059 i.t. administration.

刺激時が 1.6 ± 0.7 (n=5)，ビークル刺激時は 0.6 ± 0.4 (n=5) で有意な差は認められなかった。舌筋刺激により発現した pERK 陽性細胞数は，カプサイシン刺激時の Vc で 205.8 ± 32.6（n=5)，NTS では 205.2 ± 9.7（n=5)，Pa5 は 39.8 ± 9.1（n=5）を示し，ビークル刺激時における Vc の 73.6 ± 20.7 (n=5)，NTS の 39.8 ± 7.2 (n=5)，Pa5 の 7.4 ± 2.6（n=5）と比較し，それぞれ有意に高い値を示した。また，いずれの核も口髭部カプサイシン刺激と比較して舌カプサイシン刺激でより多くの pERK 陽性細胞発現を認めた。

3. NTS, Vc, Pa5 の pERK 陽性細胞発現と嚥下反射における PD98059 の効果

Fig.3 は PD98059 もしくはビークルを髄腔内投与した後，舌筋に 10 mM カプサイシン刺激を与えた際の NTS に発現した pERK 陽性細胞の組織標本写真である。ビークルに比較して PD98059 では pERK 陽性細胞の発現が抑えられているのがわかる。PD98059 持続投与後，口髭部カプサイシン刺激時により発現した Vc の pERK 陽性細胞数は 120 ± 17.2（n=5)，NTS は 56.2 ± 12.1 (n=5)，またビークル髄腔内投与後の

Vc においては 223.4 ± 9.0 (n=5)，NTS は 109 ± 4.3 (n=5) で，いずれも PD98059 群はビークル群に比較して有意に少ない値を示した。同様に PD98059 髄腔内投与後の舌筋カプサイシン刺激時に発現した Vc の pERK 陽性細胞数は 149.2 ± 6.5 (n=5)，NTS は 113 ± 12.1 (n=5)，Pa5 は 22.4 ± 5.1 (n=5) で，ビークル髄腔内投与時では Vc が 206.8 ± 20.5 (n=5)，NTS は 212 ± 26.8 (n=5)，Pa5 は 43.6 ± 4.9 (n=5) で，いずれの核も PD98059 群はビークル群に比較して有意に少ない値を示した。また PD98059 髄腔内投与後，口髭部または舌筋への 10 mM カプサイシン注入 6 分後の蒸留水誘発嚥下回数はそれぞれ 11 ± 1.1 (n=5)，2.8 ± 0.7 (n=5) で，ビークル髄腔内投与後の口髭部もしくは舌筋カプサイシン刺激の 4 ± 1.5 (n=5)，0.4 ± 0.2 (n=5) と比較して，いずれも有意に高い値を示した。

考　察

1. 侵害刺激による嚥下反射の調節

NTS, Vc, Pa 5 は三叉神経一次求心性神経の脳幹における標的神経核である [17,26,27]。これらの神経核は，三叉神経運動核，舌下神経核，疑核，迷走神経背側運動核などの嚥下に関連した運動ニューロン活動調節に関与するニューロンと強いシナプス結合を成している [2,18,33]。我々は C 線維と Aδ 線維とを特異的に活性化するカプサイシンを口腔顔面領域に対する侵害刺激として用いた。口髭部，舌筋へのカプサイシン注入によりカプサイシン濃度依存的に嚥下回数の減少を認め，さらに高濃度刺激ではビークル刺激と比較して有意に嚥下回数の減少が観察された。これらのことは口腔顔面侵害入力が嚥下反射の抑制に関与していることを示唆している。また舌筋は口髭部に比較して低濃度でも嚥下回数の有意な減少を認めており，これは舌刺激が口髭部刺激に比較してより強く嚥下反射を抑制していることを意味していると考えられる。

2. 嚥下反射における NTS, Vc, Pa5 ニューロンの関連

NTS, Vc, Pa5 ニューロンが口腔顔面領域における多様な侵害刺激によって強く活性化されることはよく知られている [3,7,29]。口髭部皮下，舌筋へのカプサイシン注入後，これらの神経核での pERK 陽性細胞数がビークル注入後と比較して有意に高い値を示し，またそれぞれの神経核において pERK 陽性細胞の発現パターンがカプサイシン注入部位ごとに異なることを観察した。それぞれの神経核において，pERK 陽性細胞は異なる発現パターンを示していることから，それぞれの核が顎顔面領域の感覚と運動機能に対して異なる役割を担っている可能性があると想像される。

NTS は嚥下に加えて味覚，内臓感覚，呼吸，血圧などの調節にも関与している [1,6,9,12,22,23,28]。NTS の多岐にわたる役割から，この核の機能的複雑性が想像される。従来の研究では，NTS 侵害受容ニューロンが自律神経と呼吸の調節に関与していることが報告されており，NTS に存在する侵害受容ニューロンが運動機能の調節に対して重要な役割を成す可能性があることを示している [1]。また，大腿三頭筋の収縮により活性化される Aδ および C 線維が NTS ニューロン活動を変調するという報告もあり，これらと本研究結果を考え合わせると口髭部，舌筋への侵害刺激による NTS ニューロンの興奮性増加が嚥下反射抑制を強く誘導した可能性があると考えられる [19]。さらに，多くの Vc ニューロンが

口腔顔面領域からの侵害入力を受け取っており，Vc は高次中枢領域に対する口腔顔面侵害入力の重要な中継核として知られている[7,25]。本実験ではカプサイシン刺激後，Vc における pERK 陽性細胞の発現が有意に高くなっており，口腔顔面領域の侵害入力が Vc を介して NTS へと情報を伝達し嚥下反射を抑制している可能性が推察される。しかし，Vc の部分切除を行った結果，本研究において記録した嚥下反射は有意な影響を受けなかった[30]。この結果から，おそらく Vc ニューロンは嚥下反射調節に対して関与が弱い可能性があると考えられる。

さらに NTS は Pa5 からの強い入力も受け取っており，また多くの Pa5 ニューロンが TMJ，咬筋，歯髄への侵害刺激により活性化されることが報告されている[2,3,8,24]。我々は舌筋刺激後多くの Pa5 ニューロンの活性化を認めたが，口髭部刺激では認めなかった。このことと，口髭部刺激に比較して舌筋刺激でより強い嚥下反射抑制を観察したことから，舌筋からの侵害入力が Pa5 を介して NTS へと投射し，嚥下反射調節に関与している可能性が考えられる。

3. MEK1/2 インヒビター PD98059 投与の効果

PD980959 は ERK リン酸化のインヒビターとして知られている[10]。ビークル髄腔内投与に比較して PD98059 髄腔内投与は 10 mM カプサイシン刺激後の NTS, Vc, Pa5 における pERK 陽性細胞数の有意な減少と嚥下回数の有意な増加を誘導した。ERK のリン酸化を阻害することにより抑えられていた嚥下反射が回復しており，これは ERK のリン酸化が口腔顔面領域のカプサイシン刺激により誘導された嚥下反射抑制に関与していることを示している。

文　献

1) Boscan, P., Pickering, A.E., Paton, J.F., The nucleus of the solitary tract: an integrating station for nociceptive and cardiorespiratory afferents, Exp. Physiol., 87 (2002) 259-266.

2) Caous, C.A., de Sousa Buck, H., Lindsey, C.J., Neuronal connections of the paratrigeminal nucleus: a topographic analysis of neurons projecting to bulbar, pontine and thalamic nuclei related to cardiovascular, respiratory and sensory functions, Auton. Neurosci., 94 (2001) 14-24.

3) Chattipakorn, S., Chattipakorn, N., Light, A.R., Narhi, M., Maixner, W., Comparison of Fos expression within the ferret's spinal trigeminal nuclear complex evoked by electrical or noxious-thermal pulpal stimulation, J. Pain, 6 (2005) 569-580.

4) Dubner, R., Sessle, B.J., Storey, A.T., The Neural Basis of Oral and Facial Function, Plenum Publishing Corporation, 1978.

5) Ertekin, C., Secil, Y., Yuceyar, N., Aydogdu, I., Oropharyngeal dysphagia in polymyositis/dermatomyositis, Clin. Neurol. Neurosurg., 107 (2004) 32-37.

6) Feldman, P.D., Felder, R.B., Alpha-adrenergic influences on neuronal responses to visceral afferent input in the nucleus tractus solitarius, Neuropharmacology, 28 (1989) 1081-1087.

7) Imbe, H., Dubner, R., Ren, K., Masseteric inflammation-induced Fos protein expression in the trigeminal interpolaris/caudalis transition zone: contribution of somatosensory-vagal-adrenal integration, Brain Res., 845 (1999) 165-175.

8) Imbe, H., Ren, K., The up-regulation of preprodynorphin mRNA in trigeminoparabrachial neurons after inflammation, Neuroreport, 11 (2000) 845-847.

9) Jean, A., Brain stem control of swallowing: neuronal network and cellular mechanisms, Physiol. Rev., 81 (2001) 929-969.

10) Ji, R.R., Baba, H., Brenner, G.J., Woolf, C.J., Nociceptive-specific activation of ERK in spinal neurons contributes to pain hypersensitivity, Nat. Neurosci., 2 (1999) 1114-1119.

11) Kajii, Y., Shingai, T., Kitagawa, J., Takahashi, Y., Taguchi, Y., Noda, T., Yamada, Y., Sour taste stimulation facilitates reflex swallowing from the pharynx and larynx in the rat, Physiol. Behav., 77 (2002) 321-325.

12) Katz, D.M., Karten, H.J., Visceral representation within the nucleus of the tractus solitarius in the pigeon, Columba livia, J. Comp. Neurol., 218 (1983) 42-73.

13) Kessler, J.P., Cherkaoui, N., Catalin, D., Jean, A., Swallowing responses induced by microinjection of glutamate and glutamate agonists into the nucleus tractus solitarius of ketamine-anesthetized rats, Exp. Brain Res., 83 (1990) 151-158.

14) Kessler, J.P., Jean, A., Identification of the medullary swallowing regions in the rat, Exp. Brain Res., 57 (1985) 256-263.

15) Kessler, J.P., Jean, A., Effect of catecholamines on the swallowing reflex after pressure microinjections into the lateral solitary complex of the medulla oblongata, Brain Res., 386 (1986) 69-77.

16) Kronenberger, M.B., Meyers, A.D., Dysphagia following head and neck cancer surgery, Dysphagia, 9 (1994) 236-244.

17) Li, Y.Q., Takada, M., Mizuno, N., Identification of premotor interneurons which project bilaterally to the trigeminal motor, facial or hypoglossal nuclei: a fluorescent retrograde double-labeling study in the rat, Brain Res., 611 (1993) 160-164.

18) Luo, P., Zhang, J., Yang, R., Pendlebury, W., Neuronal circuitry and synaptic organization of trigeminal proprioceptive afferents mediating tongue movement and jaw-tongue coordination via hypoglossal premotor neurons, Eur. J. Neurosci., 23 (2006) 3269-3283.

19) Potts, J.T., Waldrop, T.G., Discharge patterns of somatosensitive neurons in the nucleus tractus solitarius of the cat, Neuroscience, 132 (2005) 1123-1134.

20) Robbins, J., Levin, R.L., Swallowing after unilateral stroke of the cerebral cortex: preliminary experience, Dysphagia, 3 (1988) 11-17.

21) Roy, N., Stemple, J., Merrill, R.M., Thomas, L., Dysphagia in the elderly: preliminary evidence of prevalence, risk factors, and socioemotional effects, Ann. Otol. Rhinol. Laryngol., 116 (2007) 858-865.

22) Schwartzbaum, J.S., DiLorenzo, P.M., Gustatory functions of the nucleus tractus solitarius in the rabbit, Brain Res. Bull., 8 (1982) 285-292.

23) Scott, T.R., Yaxley, S., Sienkiewicz, Z.J., Rolls, E.T., Gustatory responses in the nucleus tractus solitarius of the alert cynomolgus monkey, J. Neurophysiol., 55 (1986) 182-200.

24) Shimizu, K., Asano, M., Kitagawa, J., Ogiso, B., Ren, K., Oki, H., Matsumoto, M., Iwata, K., Phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase in medullary and upper cervical cord neurons following noxious tooth pulp stimulation, Brain Res., 1072 (2006) 99-109.

25) Takemura, M., Sugiyo, S., Moritani, M., Kobayashi, M., Yonehara, N., Mechanisms of orofacial pain control in the central nervous system, Arch. Histol. Cytol., 69 (2006) 79-100.

26) Takemura, M., Tsujio, A., Iwase, K., Shimada, T., Shigenaga, Y., Central terminals of orofacial primary afferents and NADPH-diaphorase activity in the trigemino-solitary complex of rats, Brain Res., 781 (1998) 77-89.

27) Takemura, M., Wakisaka, S., Iwase, K., Yabuta, N.H., Nakagawa, S., Chen, K., Bae, Y.C., Yoshida, A., Shigenaga, Y., NADPH-diaphorase in the developing rat: lower brainstem and cervical spinal cord, with special reference to the trigemino-solitary complex, J. Comp. Neurol., 365 (1996) 511-25.

28) Travers, J.B., Smith, D.V., Gustatory sensitivities in neurons of the hamster nucleus tractus solitarius, Sens. Processes, 3 (1979) 1-26.

29) Tsai, C.M., Chiang, C.Y., Yu, X.M., Sessle, B.J., Involvement of trigeminal subnucleus caudalis (medullary dorsal horn) in craniofacial nociceptive reflex activity, Pain, 81 (1999) 115-128.

30) Tsujimura, T., Tsuboi, Y., Kondo, M., Kitagawa, J., Iwata, K., Involvement of ERK phosphorylation in modulation of swallowing reflex in rats, 12th World Congress on Pain, 2008, Presentation Number PT 063

31) Vaiman, M., Nahlieli, O., Eliav, E., Oynophagia in patients after dental extraction: surface electromyography study, Head Face Med., 2 (2006) 34.

32) Wang, Y.T., Bieger, D., Role of solitarial GABAergic mechanisms in control of swallowing, Am. J. Physiol., 261 (1991) R639-646.

33) Zec, N., Kinney, H.C., Anatomic relationships of the human nucleus of the solitary tract in the medulla oblongata: a DiI labeling study, Auton. Neurosci., 105 (2003) 131-144.

34) Zimmermann, M., Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals, Pain, 16 (1983) 109-110.

35) Zoungrana, O.R., Lamkadem, M., Amri, M., Car, A., Roman, C., Effects of lingual nerve afferents on swallowing in sheep, Exp. Brain Res., 132 (2000) 500-509.

Address for correspondence: Koichi Iwata
Department of Physiology, Nihon University School of Dentistry
1-8-13 Kanda-Surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo 101-8310, Japan
TEL: 03-3219-8122