

平成30年6月6日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06961

研究課題名(和文) 自然睡眠中の顎運動リズム発生に対するストレスの生理学的作用機序の解明

研究課題名(英文) Effects of stress on rhythmical masticatory muscle activity during sleep

研究代表者

東山 亮 (Makoto, Higashiyama)

大阪大学・歯学研究科・特任研究員

研究者番号：50781663

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：自然睡眠中のモルモットにおいて、Rhythmical masticatory muscle activity (RMMA)が発生することを見出し、その発生における覚醒過程や閉口筋活動特性が、ヒトのRMMAと類似していた。このモデルを用いて、実験的ストレスを与えると、ストレス負荷直後に、一過性のノンレム睡眠の減少とRMMAの発現頻度の増加を認めた。また、ストレスに関連する扁桃体には、リズムカルな閉口筋を誘発できる部位が存在していた。したがって、睡眠時のRMMAの発現様態にストレスが影響を与える可能性が考えられ、ストレス応答に関連する脳部位との機能相関が今後の研究課題となりうる。

研究成果の概要(英文)：Rhythmic masticatory muscle activity (RMMA) was found to occur during NREM sleep in guinea pigs. Physiological characteristics were similar to RMMA in humans, as the occurrence of RMMA was associated with arousal processes. Electromyographic characteristics of RMMA in guinea pigs were also similar to those in humans. Using this animal model, experimental stress was given to the freely moving guinea pigs. During two hours after experimental stress, animals had less sleep but more RMMA. After then, these variables returned to the baseline level (i.e., without stress). Rhythmic masseter activity was found to be triggered when micro-electrical stimulations were given to the ventral areas of amygdala in anesthetized guinea pigs. These suggest that experimental stress can increase the generation of RMMA and the roles of amygdala need to be investigated in the future study.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：ブラキシズム ストレス 睡眠

1. 研究開始当初の背景

睡眠時ブラキシズムは、歯の咬耗や破折・喪失、補綴・修復、インプラント治療の失敗、顎関節症や頭痛の原因と考えられ、歯科臨床、特に補綴歯科臨床において非常に問題とされる睡眠障害である。近年、日本を含め、国際的にも睡眠時ブラキシズムの臨床研究が活発に行われているものの、睡眠時ブラキシズムの原因や発生機序は未だ明らかになっていない。現在、睡眠時ブラキシズムの病因論では、異なる組み合わせで複数の因子が作用する(多因子論)と考えられており、多数のリスクや原因因子が候補として挙げられている。しかし、特定の因子が、睡眠時ブラキシズムに作用・影響する機序も良くわかっていない。睡眠時ブラキシズムの原因因子の一つとして、ストレスが疑われている。これまでに、ストレスと睡眠中の咀嚼筋活動との関係を明らかにするために、数多くの臨床研究が行われてきた。しかし、それらの研究間で、ストレスの睡眠時ブラキシズムの関係について得られた結果が一致しておらず、現時点では、ストレスと睡眠時ブラキシズムの因果関係は示されていない。

2. 研究の目的

実験的ストレス負荷が実験動物のノンレム睡眠中の顎運動発現特性を修飾する生理学的機序と、ストレス関連部位による運動リズム発生機構を、神経生理学および行動生理学的な方法を用いて明らかにする。

3. 研究の方法

1) 実験動物には Hartley 系雄性モルモットを用いた。全身麻酔下で、脳波と眼電図の測定のためネジ電極を頭蓋骨に設置し、心電図と筋電図(頸筋・咬筋・顎二腹筋)を測定するためのワイヤー電極をそれぞれの位置へ設置した。記録電極は皮下を通して頭頂部へ誘導し、接続用コネクタと連結した。また脳定位固定装置に動物の頭部を着脱可能とするアタッチメントを固定した。安定した動物の睡眠を確保するため、外科手術後の回復期

間(約2週間)に、動物を実験環境に順応させた。頭部に記録ケーブルを接続し、睡眠覚醒のモニターと電極状態を確認した。

Footshock 刺激(FS)を用いて、実験的ストレスを誘発した。初日はFSを与えず、対象条件のデータとした。2日目にFSを30分間(0.5mA、1分間隔)与えた上で、自由行動させた。脳波、眼電図、心電図、筋電図の各信号は、多用途監視記録装置により増幅し、A/D変換器にてデジタル信号に変換後、波形解析ソフトを用いてコンピューターに記録した。また一部の動物において、刺激電極を錘体路に留置し、睡眠中に連続電気刺激を与えてRMMAを誘発した。

データを視覚的に判定し、睡眠(ノンレム睡眠・レム睡眠)・覚醒を判定し、睡眠覚醒に関する変数を算出した。また、ノンレム睡眠中のRMMAをスコアし、発生頻度や筋活動特性、脳波活動や心拍変動を定量化した。また、覚醒中のリズムカルな非機能的顎運動(NFRMMA)や咀嚼時間も定量化した。これらの変数の時系列変化を調べ、FS時とFSを与えない時(nonFS)とで比較した。また、錘体路刺激によって誘発したRMMAの解析も実施した。

2) Hartley 系雄性モルモットを用いて、全身麻酔下で、脳波と眼電図の測定のためネジ電極を頭蓋骨に設置し、筋電図(咬筋・顎二腹筋)を測定するためのワイヤー電極をそれぞれの位置へ設置した。記録電極は皮下を通して頭頂部へ誘導し、接続用コネクタと連結する。また脳定位固定装置に動物の頭部を着脱可能とするアタッチメントを固定した。さらに、下顎切歯部には、顎運動記録のためのLEDを歯科用レジンセメントにて装着した。

麻酔状態の実験動物を脳定位固定装置に装着し、扁桃体相当部の頭蓋骨を除去し開窓した。ガラスコーティングした金属電極を刺入し、連続電気刺激を与えて、顎筋活動やリズムカルな顎運動(RJM)が生じる部位のマッピング

ングを行った。実験終了後、刺激部位を確認するため、過剰量の麻酔薬を投与し、灌流・固定を行い、脳を摘出した。連続感情切片を作成し、スライドガラスに張り付け乾燥した後、Neutral Red で染色を施し、脱水透徹しカバーガラスをかけた。その後、光学顕微鏡を用いて観察し、RJM を誘発できた部位を同定した。同定に際して、脳アトラスを参考にして扁桃体の垂核を災防協地区学的に同定した。誘発した RJM の顎運動軌跡について、解析ソフトを用いて、運動特性を数値化した。

4. 研究成果

1) ストレスによる RMMA 発生の変化

・動物の RMMA：ノンレム睡眠一時間あたり 6 回程度の反復性の咀嚼筋活動を認めた。咬筋バーストの周期・持続時間・総活動量・平均活動量は右裾広がり分布を示した。一方、咀嚼時にはこれらの変数の分布は正規分布を示した。RMMA のバーストは、咀嚼時のバーストに比べて、バースト周期および持続時間やその変動が大きい（安定性が低い）が、積分筋活動量は低かった。また、RMMA は、一時的な RR 間隔の減少と脳波活動の変化を伴っていた。これらの特性を、ヒトの RMMA と比較した。ヒトでは、RMMA は睡眠一時間あたり平均 1.3 回発生した。その咬筋バーストの各変数の分布は、動物と同様に右裾広がり分布で、咀嚼時は正規分布を示した。動物と同様に、RMMA は咀嚼よりバースト周期・持続時間が長く変動も大きい。積分筋活動量は咀嚼よりも低かった。また、RMMA 発生には、一時的な RR 間隔の減少や脳波活動の変化を伴った。

睡眠中に皮質下行路を電気刺激して RMMA を誘発できたが、覚醒と比べると応答性が低下した。また、RMMA の応答特性はノンレム睡眠とレム睡眠で大きく異なり、RMMA はレム睡眠で誘発することはできなかった。

以上の結果から、モルモットのノンレム睡眠で発生する反復性の咀嚼筋活動の生理学

的特性には、ヒトの RMMA との類似点が複数あった。また、RMMA 発生に関わる神経機構のは活動性が、ノンレム睡眠とレム睡眠で異なることが分かった。以上から、動物モデルを用いた睡眠時ブラキシズムの研究に有用な、ノンレム睡眠における筋電図学的指標と考えられる (Kato et al., J Sleep Res, in press) .

・ストレス条件負荷による変化

FS 直後 2 時間で、ノンレム睡眠、レム睡眠の占有率が、対照条件の 2 時間と比べて有意に減少した。逆に、覚醒の占有率は有意に増加した。しかし、その後の 4 時間では、ノンレム睡眠とレム睡眠、覚醒の占有率に二つの条件間で有意な差を認めなかった。また、FS 直後 2 時間では、ノンレム睡眠とレム睡眠の発生頻度は減少したが、それぞれの睡眠の平均持続時間には有意な差を認めなかった。しかし、それ以後は、ノンレム睡眠、レム睡眠の発生頻度と持続時間に、対照条件との差を認めなかった。ノンレム睡眠、レム睡眠、覚醒における咬筋と顎二腹筋前腹の積分筋活動量は、対照条件とストレス条件の間に有意差を認めなかった。一方、ノンレム睡眠中に発生する RMMA の発生頻度は、ストレス条件の FS 直後 2 時間では、対照条件と比べて有意に高かった。それ以後の時間ではノンレム睡眠中に発生する RMMA の発生頻度は、二つの条件間で有意な差を認めなかった。また、錘体路刺激によって、ノンレム睡眠で RMMA を誘発できたが、レム睡眠では誘発できなかった。

以上より本研究では、実験動物において急性 FS ストレスが、一時的にノンレム睡眠と REM 睡眠を抑制し覚醒を促進させることから、睡眠調節と覚醒調節のバランスを変える可能性が示唆された。またストレスによって、睡眠中の開閉口筋の筋活動量には変化が生じなかったが、ノンレム睡眠中の RMMA の発生頻度が増加したことから、急性ストレスは

睡眠中の顎運動調節に関わる神経機構の全体的な活動性に变化を与えるのではなく、RMMA のような特定の活動パターンの発生に関わる神経機構の活動性を上昇させる可能性が示唆された。

2) RJM 発生に関わるストレス関連部位

扁桃体およびその周囲領域に対して、短時間連続刺激を与えると、顎筋に短潜時応答を誘発できた。この応答は、刺激と同側優位な応答で、顎二腹筋と咬筋に応答を認めるものと、どちらか一方のみに応答を認めるものがあった。誘発した短潜時応答の 80%以上において、両側顎二腹筋と咬筋の活動を認めた。短時間連続刺激を与えて短潜時応答を誘発できた部位は、扁桃体の腹側領域に分布した。

短時間連続刺激に応答した部位に、長時間連続刺激を与えると、一部の部位で、持続的な開口運動、リズムカルな単純開閉口運動、刺激と同側方向への側方運動を伴うリズムカルな開閉口運動を誘発できた。長時間連続刺激で誘発した3種の顎運動の割合は、それぞれ 45.7%、27.2%、27.7%であった。長時間連続刺激を与えて顎運動を誘発できた部位は、短潜時応答を誘発でき領域より狭い範囲に分布し、特に内側核、基底核、皮質核に集中した。側方運動を伴う RJM を誘発した部位は、皮質核に局限していた。

長時間連続刺激で誘発した持続的な開口運動は、左側への側方移動を伴っていた。一方、2種類のリズムカルな開閉口運動を比較すると、単純開閉口運動と比べて、側方運動を伴うリズムカルな開閉口運動の方が、開口量が約 1.4 倍、側方移動量は約 4.4 倍程度大きかった。しかし、開閉口 1 サイクルあたりの平均持続時間は、2種類のリズムカルな開閉口運動で大きな差を認めなかった。

以上から、扁桃体の腹側領域で短潜時応答を誘発でき、さらに内側核、基底核、皮質核で RJM を誘発できた。したがって、モルモツ

トにおいて、扁桃体では、これらの領域が顎運動の調節に関わるが、部位によって調節様式は異なる可能性が示唆された。また、誘発できた RJM は、同側優位な短潜時応答や側方運動であることから、本実験で刺激を与えた扁桃体腹側領域から脳幹の顎運動調節に関与する神経網へ、同側優位な下行路を有する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

・加藤隆史, 東山亮. 睡眠時ブラキシズムの病態生理からみたスプリントの臨床的役割. 歯界展望, 127(6):1178-1185, 2016.

・Kato T, Toyota R, Haraki S, Yano H, Higashiyama M, Ueno Y, Yano H, Sato F, Yatani H, Yoshida A. Comparison of rhythmic masticatory muscle activity during non-rapid eye movement sleep in guinea pigs and humans. J Sleep Res. 2017 Sep 27. doi: 10.1111/jsr.12608. [Epub ahead of print]

[学会発表](計5件)

・東山亮, 佐藤文彦, 矢谷博文, 吉田篤, 加藤隆史: 睡眠中の錐体路電気刺激に対するリズムカルな顎運動の応答特性 第9回 三叉神経領域の感覚-運動統合機構研究会、2016年11月26日-27日、佐久

・Ueno Y, Kato T, Ali MD SS, Yano H, Higashiyama M, Sato F, Yoshida A. Mapping jaw motor responses to electrical stimulation in amygdala in guinea pigs. Oral Neuroscience 2016, 2016年10月1日、吹田

・Higashiyama M, Kato T, Yano H, Ueno Y, Sato F, Yatani H, Yoshida A. Excitability of Masticatory Motor System in Sleeping Guinea Pigs. 95th IADR 2017/3/22-25 Sanfrancisco, USA

・Yano H, Yano H, Ueno Y, Higashiyama M, Uzawa N, Yoshida A, Kato T. Acute footshock stress can modulate the vigilance states and jaw muscle activities in guinea pigs. The 3rd Oral Neuroscience, 2017/8/26, Osaka University Graduate School of Dentistry, Osaka, Japan

・加藤隆史, 豊田理紗, 原木真吾, 矢野博之, 矢野浩司, 東山亮, 吉田 篤. 実験動物とヒトのノンレム睡眠時リズム性咀嚼筋活動の類似性. 第9回日本臨床睡眠医学会学術集会, 2017/9/29-10/1, 金沢

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

東山 亮 (HIGASHIYAMA, Makoto)
大阪大学・大学院歯学研究科・特任研究員
研究者番号：50781663

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()