

平成 21 年 4 月 1 日現在

研究種目：若手研究(スタートアップ)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19890221
 研究課題名(和文) 離乳期の食育環境が中枢神経系発達に及ぼす影響の解明
 研究課題名(英文) The study of influence of weaning feeding condition to the central nerve development

研究代表者
 大岡 貴史 (OOKA TAKAFUMI)
 昭和大学・歯学部・助教
 研究者番号 30453632

研究成果の概要：

本研究では、新生仔ラットの離乳期間中(生後 21 日まで)の栄養摂取方法が、摂食機能に深く関連する中枢神経の発達変化にどのような影響を与えるかを検討した。その結果、口からではなく胃瘻(経管チューブ)のみで栄養摂取してラットや、固形食を摂取せずミルクのみを摂取したラットでは舌の動きを司る舌下神経核の活動が未熟であった。また、口腔や咽頭(のど)の感覚を司る迷走神経核では、胃瘻ラットにおける神経活動が低かった。これらより、離乳期の栄養摂取方法は摂食機能の発達・成熟に関連する中枢神経核の発達変化に影響を与える可能性があると考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,330,000	0	1,330,000
2008年度	1,350,000	405,000	1,750,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,680,000	0	3,080,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：7409

キーワード：摂食機能、発達、離乳、細胞・組織、神経科学

1. 研究開始当初の背景

乳幼児の摂食機能発達に関するこれまでの研究では、口唇・舌・顎の動きなどの外部評価観察、超音波エコー、嚥下造影検査などの計測機器を用いた舌運動や嚥下機能の発達について解明された。その結果、摂食機能は感覚・運動学習によって獲得されるものであり、哺乳・離乳期の感覚体験が重要であるとされている。

ラットはヒトと同様に、出生直後から母乳摂取を中心とした哺乳期から始まる。その後、

生後 13 日前後から徐々に固形食(固形飼料)の摂取が始まることで離乳期に入り、生後約 21 日で離乳が完了するという過程を経る。

ラットの摂食機能発達に関する研究では、生後日数によって摂食行動に関連する中枢神経核の神経活動が変化すること、その変化は三叉神経核や舌下神経核、孤束核など、神経核によって異なることが明らかになっている。また、また、主任研究者である大岡らにより、離乳完了期では離乳期に摂取した食餌によって神経活動が変化することが示唆

されている。

以上より、実験動物の離乳期における食餌摂取経験を中心とした飼育環境の変化と中枢神経の発達を検討することで、「乳幼児における離乳期の哺乳方法や離乳時期と摂食機能発達に関連」を解明できるものと考えられた。

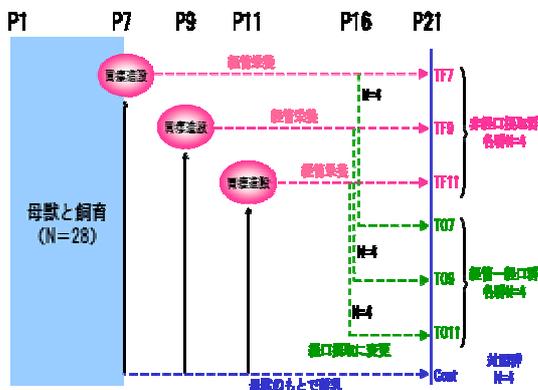
2. 研究の目的

本研究は、生後から離乳期における摂食方法（経管栄養と経口摂取）および食形態（固形食と液状食品）によって哺乳から咀嚼への機能発達の過程での中枢神経発達に変化を生じるか否かを、哺乳類である新生仔ラットを用いて検討し、離乳期の食環境が摂食機能に関連する中枢神経系の遺伝子発現に与える影響を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

出生直後の Sprague-Dawley (SD) 仔ラット（出生 24 時間後を生後 1 日とし、以下 P1 とする）を P6 まで母獣と同じケージにて飼育した。

P7、9、11 の時点で仔ラットに胃瘻造設を行い、以降はラット用ミルクを 1 日 10 回注入し、経管栄養下にて飼育した。P16 の時点で、経管栄養にて飼育していたラットのうち各群 4 匹の経管栄養を中止し、固形飼料および水を自由に摂取させた状態で P21 まで飼育した（図 1）。



< 図1 実験スケジュールの概要 >

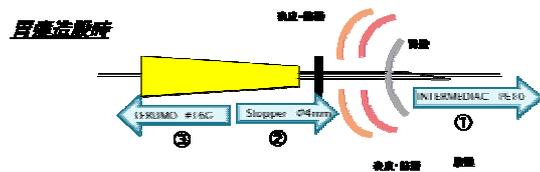
P16 の時点で、経管栄養にて飼育していたラットのうち各群 4 匹の経管栄養を中止し、固形飼料および水を自由に摂取させた状態で P21 まで飼育した（図 1）。

ラットやマウスなどの小動物に対する胃瘻造設については、これまで数種類の方法が行われているものの、離乳期に適した方法はほとんど報告されておらず、経口摂取を行ったラットと比較して体重増加が不良であることが多い。そのため、より侵襲が少なく、十分な身体発育が得られる胃瘻造設方法を考

案した（図 2、3）。



< 図2 P7ラットへの胃瘻造設術 >



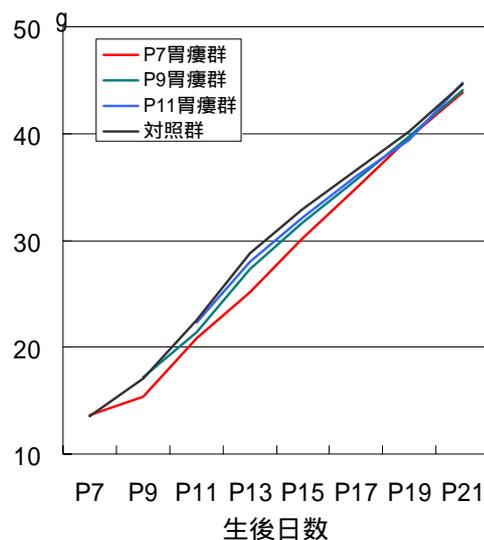
< 図3 胃瘻造設方法の詳細 >

この方法にて P9、11 の時点でラットに胃瘻造設を行い、以後は P21 まで非経口摂取状態にて飼育した群と、P16 の時点から固形飼料を経口摂取させ始めた群とに分けて飼育した。

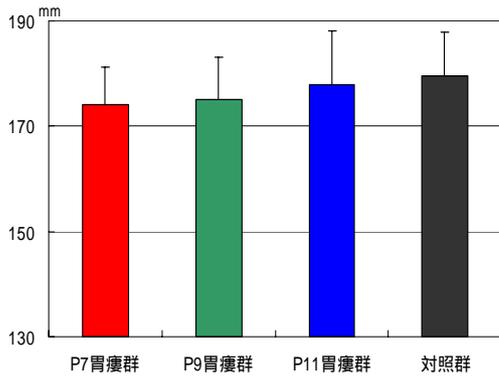
P21 の時点で全てのラットを灌流固定・抜脳を行い、脳幹部の冠状切片を作成した上で、Fos タンパクを指標とした免疫組織染色を行った。

4. 研究成果

(1) ラットの身体発育について



< 図4 ラットの体重増加の推移 >



< 図 5 P21 における体長 >

P7、9、11 に胃瘻造設を行い、P21 まで経管栄養のみで飼育したラットおよび対照ラットの体重増加の推移を図 4 に示す。P7 に胃瘻造設を行った群では、術後 2 日間の体重増加は十分に得られず、対照群との間に明らかな差を認めた。一方、P11 以降は安定した体重増加が得られ、P18 以降は対照群とほぼ同様の数値を示した。P9 および 11 に胃瘻造設を行ったラットでは、術後すぐに安定した体重増加が得られ、P7 胃瘻造設群よりも早期に対照群と同様の体重となった。

図 5 では、P21 における各群ラットの体長（鼻部先端～尾部先端）を示す。体重と同様に、各群の間に明らかな差はみられず、胃瘻造設を行ったラットにおいても経口摂取ラットと同様の身体発育が得られたと考えられた。

以上により、本研究で考案した仔ラットへの胃瘻造設手技を行った場合、離乳後期～完了期では通常のラットと同等の身体発育を得られる実験モデルが確立された。

胃瘻造設手技を確立したことにより、

P7 から経管のみ：TO7

P7 から経管、P16 から経口摂取：TF7

P9 から経管のみ：TO9

P9 から経管、P16 から経口摂取：TF9

P11 から経管のみ：TO11

P11 から経管、P16 から経口摂取：TF11

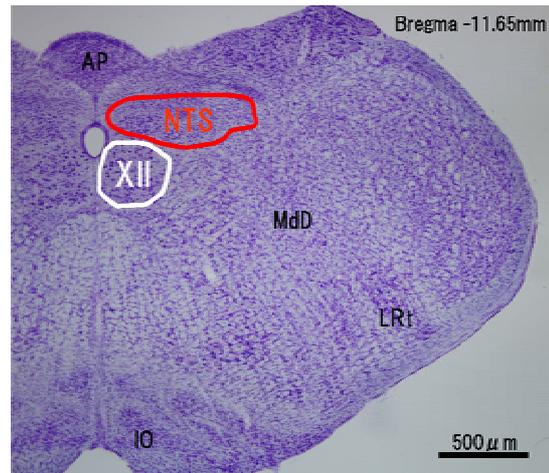
P21 まで継続して経口摂取：Cont

という経口摂取方法を変化させた 7 群を設定し、実験を行った。

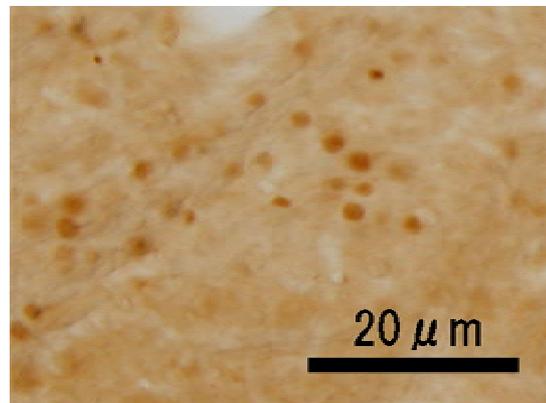
(2) ラットの中樞神経発達について

P21 ラットの脳幹部を厚さ 50 μ m に薄切し、Nissl 染色を行った標本の顕微鏡写真を図 6 に示す。本研究では、図示した神経核のうち、舌下神経核 (XII)、延髄孤束核 (NTS) における神経活動を観察した。観察では、Fos をマーカーとした免疫染色を行い、光学顕微鏡陽性と判断された細胞 (FI 細胞) の数により

神経核における神経活動の指標とした。FI 細胞の例を図 7 に示す。

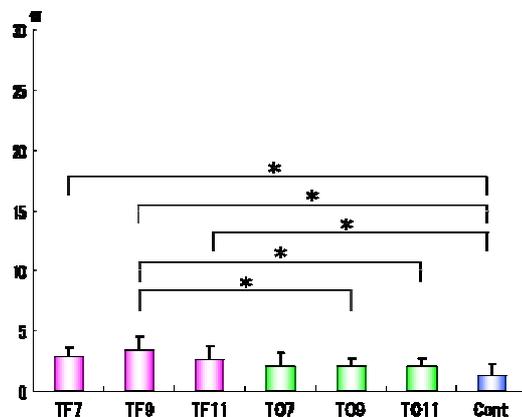


< 図 6 P21 ラットの脳幹部免疫染色標本 >



< 図 7 FI 細胞の例 >

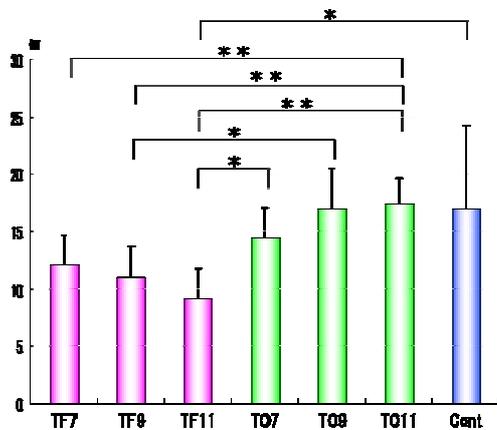
XII における FI 細胞数を図 8 に示す。通常の離乳を経て摂食機能が成熟したラットでは、吸啜・摂食に伴う XII における FI 細胞数は減少傾向にあることが知られている。対照群では他の報告と同様に FI 細胞は少ない数値を示したが、胃瘻による経管栄養を行っていた 6 群ではいずれも高値を示した。



< 図 8 XII における FI 細胞数 >

*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ by one-way ANOVA

NTSにおけるFI細胞数では、経口摂取を行っていない3群のラットでは著明に低い値を示した。一方、経管栄養から経口摂取に変更したラットでは、対照群と同様の数値を示した(図9)。



<図9 NTSにおけるFI細胞数>

*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ by one-way ANOVA

以上の研究結果から、離乳期ラットにおいて、経管栄養のみで飼育することにより、摂食・嚥下に関連する神経核における神経活動に変化が生じるとともに、離乳期後半において経口摂取を再開することでその変化が解消される可能性が示唆された。

経管栄養に関するこれまでの研究では、主に成熟ラット・マウスが用いられており、離乳期に主眼を置いた研究は非常に少ない。特に、国外では摂食機能の発達に言及した動物実験は稀であり、International Association for Disability and Oral Health (2008年10月29日、サンパウロ)にて発表した際は「栄養摂取方法の変化と中枢神経核の活動変化との関連」についての質問を受けた。International Association for Disability and Oral Healthは障害者の歯科保健を中心とした学会であり、先天性疾患を伴う児では生後に経管栄養にて栄養を摂取する機会が多い。しかしながら、経管栄養が児の発達変化に与える影響についてはほとんど報告されておらず、今後の大きな課題と考えられる。

摂食機能の発達により摂食行動そのものにも変化が生じる。本研究では、その基礎となる経管栄養ラットの実験モデルの確立、ならびに中枢神経核の活動変化について検討を行った。その結果、離乳期の栄養摂取方法により神経核の活動に変化が生じることが示唆されており、この変化により摂食行動にも差異が生じる可能性があると思われる。本研究の飼育過程で、経管栄養にて飼育したラットと通常の離乳を経たラットでは、固形飼料を与えた際の摂食行動が異なる場面が観

察されている。また、長期の経管栄養を行っていた障害児においても、経口摂取を拒否して経管からの注入を好む「経管依存症」も多く報告されつつある。

今後は、離乳期の栄養摂取方法、食環境が離乳後の食行動や社会的行動に与える影響を行動学的に解明する必要性があるものと考えられる。

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1件)

大岡貴史、拝野俊之、久保田悠、横山重幸、弘中祥司、向井美恵、胃瘻造設ラットにおける経管栄養実験モデルの検討、日摂食嚥下リハ会誌、12巻、214-222、2008 (査読有)

[学会発表](計6件)

T Ooka, Y Kubota, T Haino, S Yokoyama, S Hironaka, Y Mukai, THE EFFECT OF FEEDING METHODS ON NEURAL ACTIVITY OF CENTRAL NERVE NUCLEUS IN THE WEANING RAT. International Association for Disability and Oral Health, 2008年10月29日、サンパウロ

T Haino, T Ooka, Y Kubota, S Yokoyama, S Hironaka, Y Mukai, ESTABLISHMENT OF RAISING METHOD OF WEANING RATS OPERATED GASTROSTOMY. International Association for Disability and Oral Health, 2008年10月29日、サンパウロ

大岡貴史、久保田悠、拝野俊之、横山重幸、弘中祥司、向井美恵、離乳期ラットにおける経管栄養期間の違いが中枢神経核の神経活動に与える影響について、第14回日本摂食・嚥下リハビリテーション学会、2008年9月14日、幕張

久保田悠、大岡貴史、拝野俊之、横山重幸、馬谷原光織、弘中祥司、向井美恵、離乳期における栄養摂取方法の違いがラットの顎顔面骨の発育に与える影響、第25回日本障害者歯科学会、2008年10月10日、東京

大岡貴史、久保田悠、拝野俊之、横山重幸、弘中祥司、向井美恵、離乳期における栄養摂取方法の違いがラット中枢神経核の神経活動に与える影響について、第46回日本小児歯科学会、2008年6月12日、大宮

拝野俊之、大岡貴史、久保田悠、横山重幸、弘中祥司、向井美恵、離乳期における栄養摂取方法の違いがラットの発育状況に与える影響について、第46回日本小児歯科学会、2008年6月12日、大宮

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1)研究代表者

大岡 貴史

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：30453632