

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23593021

研究課題名(和文)超高速X線デュアルビーム撮影によるラット咀嚼、嚥下と顎舌運動の高精度3D立体解析

研究課題名(英文)Ultra-high speed x-ray movie recording of mandibular movements

研究代表者

ゼレド ジョージ(Zeredo, Jorge)

東京医科歯科大学・歯学部・非常勤講師

研究者番号：10363459

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、1)マウスなど小動物の顎運動や、四肢の運動などについて詳細な解析を行う世界初の高精細X線動画システムの開発に成功した。2)同システムにより、非侵襲的、非観血的に動物の骨格・姿勢の異常や微細な変化を精度高く検出することができた。3)低重力負荷に対するマウス姿勢応答のしくみを骨格レベルで定量的に解析し、低重力曝露時の初期応答では、頭部、脊椎、四肢の全身を調和させて姿勢制御することを明らかにした。4)姿勢変化や顎・開口反射が低重力値のみならず、特に重力減負荷速度と深い相関にあることを初めて立証し、今後の研究に新たな展望を示し、大きな波及効果が期待される。

研究成果の概要(英文)：This Kakenhi project allowed us to build a device for the study of jaw movements in the mouse through a high-definition x-ray movie system. The use of cineradiographic technology enabled us to study detailed jaw movements in the mouse in a detailed and minimally invasive fashion. In this study, we analyzed postural changes in animals exposed to gravity deceleration. Mice were exposed to partial-gravity deceleration by parabolic flights. As a result, gravity deceleration produced coordinated and generalized extension of head, jaw, spine, and hindlimbs. Joint angles in partial gravity widened about 30% or more in relation to the average 1 g posture. Reflex jaw-opening was observed during gravity deceleration. The magnitude of postural responses was associated positively with gravity deceleration. These results suggest that adaptability to partial gravity may be not only dependent on the partial-gravity level, but also on the rate of gravity change into any given partial-gravity level.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・矯正・小児系歯学

キーワード：姿勢 顎運動 放射線 低重力 マウス

## 1. 研究開始当初の背景

食物が口腔内に摂取されると、下顎運動が開始され、咀嚼、嚥下を経て食道に送り込まれる。顎運動、咀嚼、嚥下、それらにともなう舌運動は矯正治療に影響を与える最も重要な論題である。近年、矯正歯科外来では、成人患者が増加傾向にある。それにともない、審美性向上だけでなく、嚥下障害、言語障害、睡眠時無呼吸症候群のような呼吸障害、咀嚼障害など、口腔機能の回復を訴える患者が増加している。一方では、唇顎口蓋裂をはじめとする先天異常患者ならびに外科手術を必要とする顎変形症の矯正治療に保険診療が導入され、重度な機能障害を有する患者も矯正歯科外来を受診することも稀でなくなった。これらの障害をともなう不正咬合の診断には、機能障害を正確に把握するため精度の高い計測システムが必要である。

また、顎位の調節や歯の再排列などの矯正治療により、不正咬合を治療し、機能回復が可能であるかどうか重要なポイントとなる。したがって、診断のみならず、治療結果の評価や予後の推測にも精度の高い計測システムが必要とされる。動物モデルによる研究で、これらの口腔機能障害を包括的に理解する上では、神経活動や運動出力などを正確に記録する方法の選択が重要となる。摂食、咀嚼、嚥下の過程には、歯や歯周組織、咀嚼筋、顎関節、舌、頬、口唇、顔面筋、食道など様々な組織・器官が関与し、姿勢も変化する。それらの運動は中枢性の活動と協調して行われるが、不明な点が多い。

研究代表者ゼレド・ジョージは1998年以来、東京医科歯科大学での臨床と並行し、動物モデルで顎運動と咀嚼の異常が全身の姿勢に及ぼす影響を明らかにした (Zerredo et al., 2002, 2003)。また長崎大学助教時代に採択された平成19~20年度科研費研究において、不正咬合モデルラットを作製し、顎運動の特定のパラメーターと全身性ストレス応答の関連を明らかにし (Zerredo et al., 2009)、分担研究者吉田 (長崎大) らとともに、咀嚼と閉口筋活動、下顎運動との関連を明らかにした (Utsumi et al., 2010)。しかしこのマウス下顎運動記録3次元モデル (Okayasu et al., 2003) では、位置情報記録装置を埋入する外科手術が必要であり、拘束マウスを使った頭部固定 X 線撮影では、自由行動マウスに比べて大きなストレスを受け、十分な解像度も得られない。分担研究者小野 (東医歯大) は、MRI や fMRI などを用いて習慣性咀嚼側、口唇口蓋裂患者の言語障害などに関与する脳機能部位を画像化により明らかにした (Ono et al., 2006a, 2006b)。

MRI や CT は歯科臨床では顎関節症診断などで関節円板の動態分析などにも利用されている。しかし実験動物用には国内でも歯科用小型 CT が利用されているが MRI 利用設備はほとんどない。また従来のイメージングは解像度や精度にも限界があり、画像取得速度が最大 20 ミリ秒程度と遅く、骨格・姿勢や筋肉など、動物の“動き”を画像化して立体解析することは困難であった。

これに対して連携研究者長谷川 (JAXA 宇宙科学研究所) は、X 線-光変換後に光増幅器を入れることで十分な光量を確保し、被写体を高速度で撮影し、飛躍的に向上した解像度で動画としてデータを取得することができる高速 X 線撮影法を開発した。これは国際宇宙ステーションにも応用されている世界に誇る日本の映像技術であり、分担研究者桑井 (東医歯大) とともに、この技術を 3D 立体撮影へ発展させ、欧州宇宙機関によるマウス長期衛星国際プロジェクト (2016 年) に応用し、自由行動マウスの低重力応答性の姿勢・骨格、運動の微細な変化を検出する世界初の実験を計画している。この最新のスーパーテクノロジーを歯科へ応用して、顎運動の微細な動きや咀嚼、嚥下、発声などとの関連をさらに詳細に正確に解析しようとするのが本研究の着想に至った経緯である。

## 2. 研究の目的

- 1) 高速 X 線デュアルビーム撮影法を開発し、ラットの動きの高精度立体解析を行う。
- 2) 非侵襲状態でラット顎運動、咀嚼、嚥下などの微細な動きを、高精細画像化する。
- 3) 顎運動、咀嚼、嚥下、舌運動などを制御するニューラルネットワークを考察する。

## 3. 研究の方法

本研究では、我々が世界に先駆けて独自に開発した人為的重力軽減 Partial Gravity 発生技術 (Zerredo et al., 2012) を応用して、マウスの重量負荷を 1/2、1/3、1/4、1/5、1/6、1/10、1/20 の 7 段階に軽減した低重量負荷環境を創製し、各低重量負荷環境に応答するマウス顎および四肢を含む姿勢変化について、X 線動画を駆使して詳細に解析した。本研究は、東京医科歯科大学および独立行政法人宇宙航空研究開発機構の動物実験委員会の審査と認可を受けていることを付記する。

### 3.1. 実験動物

本研究では、成熟雄性マウス C57BL/6J (7 週齢、体重 23-25g、例数 n = 6) を用いた。マウスは購入後 (Charles River Laboratories 社)、愛知県名古屋空港内ダイヤモンドエ

アサービス社の動物実験飼育室（23 ±1°C、）7-19 時の 12 時間明暗サイクル）で飼育した。給餌、給水は無制限・自由摂取とした。

### 3.2. 低重力創製飛行

我々は独自の飛行軌跡を開発し、その軌跡に基づいて小型ジェット機（Mitsubishi MU-300）による放物線飛行を行い、所用の数段階の低重力環境の創製にいで世界で初めて成功した。1 日で約 2 時間の飛行を、連続 2 日間繰り返した。フライト中、各段階の低重力曝露時およびその前後の時間におけるマウス全体像を X 線動画（25Hz の静止画像）として撮影し、イメージ増幅管を通して得られた X 線透視画像（動画）をビデオカメラで収録した。

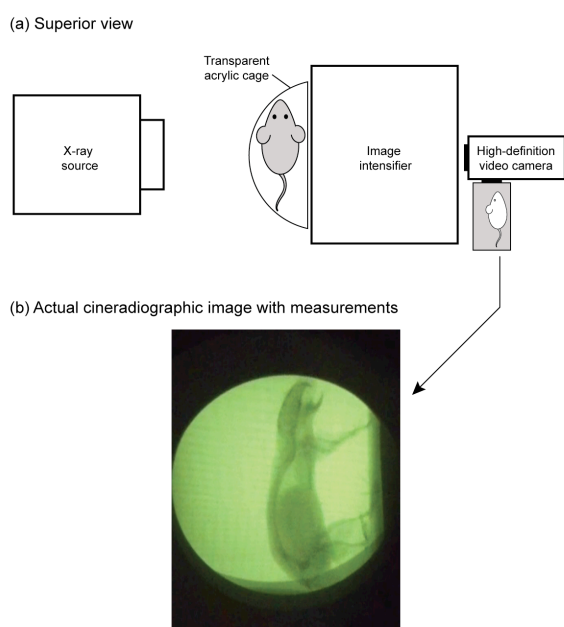


図 1 X 線動画撮影システム

### 3.3. X 線動画撮影システム

本研究を実現するために不可欠なものが、この X 線動画撮影システムである。未だ市販のものがないので、我々は必要部品を購入して、独自にシステムを組み立てた。その結果、世界初となるマイクロ焦点 X 線動画撮影システムが誕生した (Kumei et al., 2013)。本システムには従来の動物用あるいは医用 X 線に比べて 1000 倍の高精細解像能を有する X 線管を採用し、管電圧 70kV、管電流 0.3 mA の条件で撮影した。しかし、これによって得られる X 線透過像は極めて微弱であるので、X 線イメージ増幅管を通して、微弱な X 線像を可視像に変換し、その画像をビデオカメラで収録することに成功した。

X 線イメージ増幅管に入射する X 線像は、アルミニウム入力窓に形成された入力蛍光面で吸収され、シンチレーションにより光の

像となる。入力蛍光面の出力側には光電面が形成されており、光の像が光電子像に変換される。光電子像は電子レンズによって加速・集束され、出力蛍光面に衝突することによって微弱な X 線像でも目視観察可能な光の像となるしくみである (図 1)。

### 3.4. データ収集

重力データは x 軸 y 軸 z 軸の 3 方向について、機内に設置した G センサーを通して同時に 10Hz で記録し、z 軸方向の重力加速度  $g$  をマウス重力負荷値とした。さらに本研究では、重力負荷そのものへの姿勢応答のみならず、重力負荷変化速度（つまり重力加速度または重力躍度）も、動物の姿勢を制御する重要な律速因子になるのではないかと、という仮説のもとに、“G-slope”（重力変化速度）もパラメーターとして求めた。

X 線動画ビデオ画像は、おもに、水平安定飛行、低重力飛行、との両場面で収録し、コンピュータでビットマップ変換し、25Hz の静止画像として再編集し、フレーム毎に骨格角度などを計測し、また、フレーム間の角度変化をフレーム間隔の時間（25 ミリ秒）で再計算することで骨格角度の変化速度を求めた。特に低重力飛行中は、重力負荷値が刻々と変化するため、重力変動に相応した骨格角度の変動速度が重要なデータとなった。それらの主要な計測基準点となるマウス骨格部位を図 2 に示す。

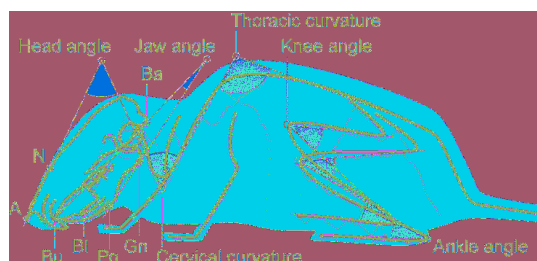


図 2 マウス姿勢解析の基準点と骨格角度

## 4. 研究成果

マウス骨格は、低重力に曝露された瞬間、その後 2~3 秒間で、骨格姿勢を変化させて低重力環境への応答を行う。したがって低重力に曝露直後 2~3 秒間が最も重要な時間となるが、その間は、重力負荷値も刻々と変化する。そこで重力値だけでなく、重力変化速度すなわち G-slope も低重力応答性の姿勢骨格の変化を解析する上で重要なパラメーターとし、姿勢骨格の変動と重力値および重力変化速度 G-slope との比較解析を行った。

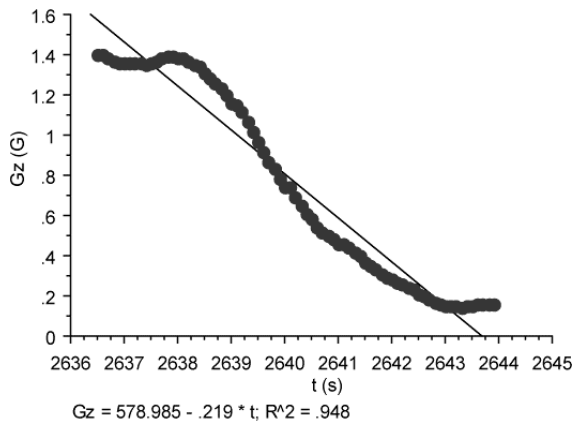


図 3. G-slope:低重力曝露中の重力変化速度

重力値対時間を示す近似直線が得られ(図3)、その近似直線の勾配から重力変化速度が求められた。

Bu-BI 距離は重力変化速度 G-slope との間に有意な正の相関性が認められた ( $P = 0.04$ )。また 上下顎間の角度(下顎の開口度)についても、G-slope の上昇ともなって大きくなる傾向が認められた ( $P = 0.08$ )。これらの低重力環境で認められた Bu-BI 距離の変化は、重力変化のない水平安定飛行中と比較して、有意に ( $P < 0.01$ ) 大きくなることが確認された (Pairwise comparisons by the Mann-Whitney U-検定)。したがって低重力飛行中に計測された頭蓋計測値 (Bu-BI 距離および下顎の開口角度) の上昇と、顎関節の開口と一致して起きることが示された (図4)。

実験的に行った研究では、前庭系刺激により、閉口筋である咬筋の筋活動の促進と抑制の両作用が報告されている (Tolu et al., 1993, 1994)。咬筋の筋活動の促進と抑制の両作用については、単一シナプス性の顎関節閉口と多シナプス性の開口反射でも報告されている (Sato et al., 2009a, 2009b)。

重力減速下では、前庭系入力刺激によって、咬筋などの顎閉口筋の抑制と前顎二腹筋などの顎開口筋の促進とを通して、顎開口反射が促進されたと考えられる。あるいは、今回観察された顎開口反射様運動については、負のストレス性信号の発声によるメカニズムも考えられる。しかし、不可避の侵襲的ストレスを予期して、22-kHz 超音波で発声するラットに対して、成熟マウスが同様のストレス状況に際して、ラットと同様の警告発声を行うとは考えにくい (Chabout et al., 2012, Portfors 2007)。

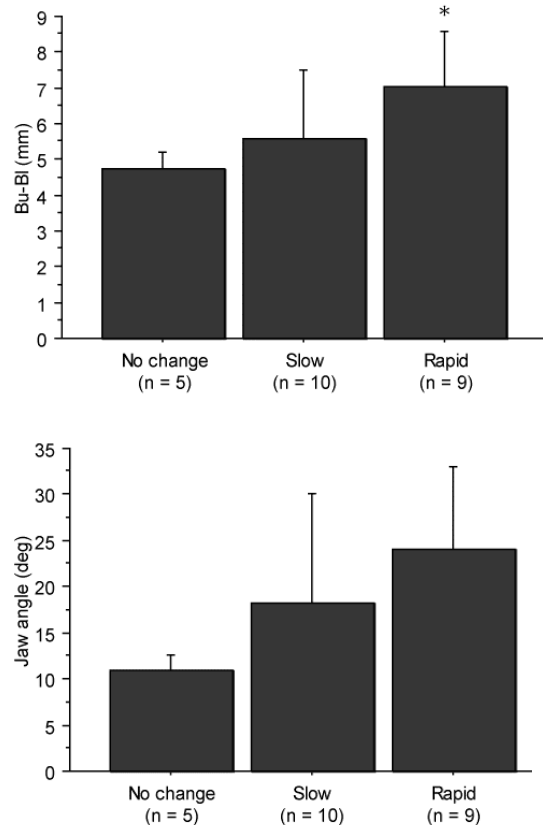


図 4. 重力変化速度とマウス顎・頭蓋計測

重力変化速度を以下の3段階カテゴリーに分別する。No-Change: constant 1G during level flight, Slow: slope of the regression line from the Gz profile during the dive phase  $> -0.02$  G/s, Rapid: slope of the regression line from the Gz profile during the dive phase  $< -0.02$  G/s.

‘No change’ に対する有意差検定、Kruskal-Wallis 検定、Mann-Whitney U-検定、\* $P < 0.05$ ; n = 観察数

低重力に曝露して最初の2~3秒間でマウス姿勢が劇的に変化している。その間は、重力レベルが急速に低下している状況であることから、この急速な重力加速度の低下によって姿勢変化とともに、開口反射が惹起されたと考えられる。

#### 【参考文献】

- 1) Zeredo, JL, et al. J Dent Res. 81:39-42, 2002.
- 2) Zeredo, JL, et al. J Dent Res. 82:402-405, 2003.
- 3) Zeredo, JL, Kumei, Y, Yoshida, N. et al. Behav Res Methods. v. 41, p. 761-764, 2009.
- 4) Okayasu I, Yoshida, N. J Dent Res. 82:318-321, 2003.
- 5) Sanefuji, K, Zeredo, JL, Yoshida, N. Journal of Japanese Society of Stomatognathic Function. 14:89-95, 2008.

- 6) Inoue MS, Ono T, et al. Orthod Craniofac Res. 9:157-162, 2006a.
- 7) Shinagawa H, Ono T, et al. Cleft Palate Craniofacial J. 43:620-624, 2006b.
- 8) Tolu E, Pugliatti M, Lacana P, Chessa G, Caria MA, Simula ME. Vestibular and somatosensory afferents modulate masseter muscle activity. J Vestib Res. 4, 303-311, 1994.
- 9) Tolu, E.; Pugliatti, M., The vestibular system modulates masseter muscle activity. J Vestib Res, 3, 163-171, 1993.
- 10) Satoh Y, Ishizuka K, Murakami T. Modulation of the masseteric monosynaptic reflex by stimulation of the vestibular nuclear complex in rats. Neurosci Lett, 466, 16-20, 2009a.
- 11) Satoh Y, Ishizuka K, Murakami T. Modulation of the jaw-opening reflex by stimulation of the vestibular nuclear complex in rats. Neurosci Lett, 457, 21-26, 2009b.
- 12) Chabout J, Serreau P, Ey E, Bellier L, Aubin T, Bourgeron T, Granon S. Adult male mice emit context-specific ultrasonic vocalizations that are modulated by prior isolation or group rearing environment. PLoS One. 7, e29401, 2012.
- 13) Portfors CV. Types and functions of ultrasonic vocalizations in laboratory rats and mice. J Am Assoc Lab Anim Sci. 46, 28-34, 2007.

#### 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)

① Zeredo, JL, Toda K, Matsuura M, Kumei Y. Behavioral response to partial-gravity conditions in rats. Neuroscience Lett. 査読有 2012, 529 (2):108-111.

② Hasegawa K, de Campos PS, Zeredo JL, Kumei Y. Cineradiographic Analysis of Mouse Postural Response to Alteration of Gravity and Jerk (Gravity Deceleration Rate). Life. 査読有 2014, 4(2):174-188.

[学会発表] (計 1 件)

Kumei Y, Zeredo JL, Inoue KA, Hasegawa K, Aou S. X-ray movie visualization for differential thresholds of mouse adaptation to low gravities. 29th Annual Meeting of the ASGSR, Hilton Lake Buena Vista, Orlando FL, USA, Nov 6, 2013.

[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

ゼレド ジョージ (ZEREDO, Jorge L.)  
東京医科歯科大学・歯学部・非常勤講師  
研究者番号：10363459

##### (2) 研究分担者

小野 卓史 (ONO, Takashi)  
東京医科歯科大学・大学院 医歯学総合研究科・教授  
研究者番号：30221857

桑井 康宏 (KUMEI, Yasuhiro)  
東京医科歯科大学・大学院 医歯学総合研究科・講師  
研究者番号：30161714

吉田 教明 (YOSHIDA, Noriaki)  
長崎大学・大学院 医歯薬学総合研究科・教授  
研究者番号：40230750

##### (3) 連携研究者

長谷川 克也 (HASEGAWA, Katsuya)  
独立行政法人宇宙航空研究開発機構・宇宙科学研究所・開発員  
研究者番号：30425780