

令和 3 年 5 月 24 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22709

研究課題名(和文)口腔機能発達不全症の動物実験系の確立

研究課題名(英文)Development of oral functions and dysfunctions in juvenile rats

研究代表者

加藤 隆史(Kato, Takafumi)

大阪大学・歯学研究科・教授

研究者番号：50367520

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：口腔機能発達のメカニズムや、口腔機能の発達に問題が生じるしくみは不明である。本研究では、発達に伴う口腔機能を行動的及び電気生理学的に記録する方法を試みるために、離乳前後のラットを用いて、その行動特性や複数の飼料の咀嚼を計測した。17日齢付近で食餌行動が開始するが、飼料咀嚼テストは21週齢以降で可能となり、飼料の咀嚼や飲水は、21日齢以降40日齢を超えるころまで変化する可能性が示された。また、生後直後の期間より、開眼後の実験介入が飼料咀嚼に影響を受ける可能性が示唆された。以上から、離乳後の発達や実験介入への影響を考慮した口腔機能発達の実験系の開発が可能と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

咀嚼など口の機能の発達の研究では、離乳期境に口の機能評価や測定が難しく、過去には乳児期動物でのin vitroの実験や、離乳から日がたった幼齢動物のin vivoの実験が多かった。本研究では、離乳直後からの咀嚼や飲水機能の測定を行い、口の機能を測定することが可能であることを示すと同時に、口の機能の発達を低下させるような実験的介入の可能性を示唆する点で学術的な意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Developmental mechanisms of oral functions such as mastication and the cause of developmental problems on oral functions remain to be clarified. This study tried to assess oral functions in developing rats. With video assessment, eating behavior was found to begin at 17 post-natal day and food test can be performed after 21 postnatal day. After weaning on 21 postnatal day, food eating and licking have changed up to more than 40 days. Moreover, these behaviors can be influenced by stress after 14 postnatal days. These suggest the possibility of future in vivo animal studies on the development of oral functions after weaning.

研究分野：口腔生理学

キーワード：発達 咀嚼 動物 モデル 離乳

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

摂食に必要な口腔機能は、生後から幼齢期にかけて、液体である母乳を摂取する吸啜に始まり、歯が萌出し固形物を摂取する咀嚼へと大きく変化する。吸啜から咀嚼への移行や咀嚼機能が確立されていく仕組みには不明な点が多い。先天的もしくは後天的に脳や顎顔面に何らかの障害を有する子どもでは咀嚼機能を十分に確立できないことが多い。また、近年では、障害や器質的な疾患がないにもかかわらず、咀嚼や嚥下の発達が不十分と考えられる「口腔機能発達不全症」という概念が生まれている。子どもにおいて、摂食に必要な口腔機能の発達が不十分であると、栄養摂取などを始め、生涯にわたる健康維持力を低下させる懸念がある。しかし、子どもが口腔機能を獲得する過程で、口腔機能の発達を低下させる要因や仕組みは不明である。

### 2. 研究の目的

定型発達児における口腔機能発達不全の機能的背景には、機能障害に至らないレベルで、脳内の運動学習能力の低下が一因と考えられる。しかし、乳幼児期の口腔機能発達に関する科学的基盤は乏しい。本研究は、幼齢ラットにおいて、離乳期以降における口腔機能の経日的変化を行動学的および生理学的に定量化する方法を検討するとともに、口腔機能の獲得能力を低下させる実験的介入の方法を検証することを目的とする。

### 3. 研究の方法

SD ラットを用いて、以下の行動評価実験を実施した。すべての仔ラットは母ラットとともに温度(23±1 )および光環境(12:12 明暗周期)を一定に管理した環境で飼育した。

#### [1]行動テスト

(1) 行動発達：仔ラットをマーキングし個別識別し(N=10)、P14 から P34 までの飼育ケージ内での行動を常時ビデオ撮影した。ビデオ記録をオフラインで確認し、それぞれの仔ラットについて、開眼、嗅ぎ行動、飲水行動、ペレット摂食を開始した日齢を記録した。嗅ぎ行動は餌を捕食せず餌に顔を近づける行動、飲水行動はボトルの飲み口を2秒以上なめる行動、食餌行動は2秒以上の餌を食べる行動とした。

(2) 摂食行動：パスタ摂食行動を P18 から P50 (N=5)の間記録した。4時間の絶食後、3種類の太さの長さ4cmの乾燥パスタ(=0.9mm, 1.4mm and 1.9mm)を順に摂食させ、ビデオ記録した。オフラインにて、各パスタを完食するまでの時間を計測した。また、P21 から P49 の仔ラットに 1.2mm のパスタを30秒間摂食させ、単位時間/体重あたりに摂食したパスタの量を算出した。さらに、飼育用ペレットと同じ成分でできた実験用ペレット(直径3mm, 長さ20mm)を用いて、咀嚼開始後10秒間で消費したペレットの量を計測し、単位時間/体重当たりの摂食量を算出した。

(3) リッキングテスト：P18~P50の間、4時間の絶食後、0.1Mスクロース溶液を飲水させた。ケージ側面のシャッターの開閉を自動制御し、シャッターを開放した10秒間リッキングをさせた。シャッターが解放してからリック開始までの潜時と、10秒間のリック数を定量化した。

#### [2]電気生理学実験

##### (1) 顎反射誘発実験

口腔感覚入力に対する顎筋応答の経日的変化を調べるため、反射誘発実験を実施した。P10以

降の仔ラットに、ケタミン・キシラジンによる麻酔下で、咬筋や顎二腹筋に筋電図記録用のワイヤー電極を、前歯の歯根膜腔に刺激電極としてワイヤー電極を刺入し固定した。前肢のワイヤー電極を用いて、矩形波パルスによる電気刺激を与えて、誘発した筋電図応答を測定し、応答潜時及び応答量を定量的に解析した。

#### (2) 咀嚼筋活動記録

P9~P11の仔ラットに、イソフルラン麻酔下で、筋電図電極を設置し頭部に接続コネクタを設置した。回復後、P14以降に、授乳行動中および摂食行動中における咬筋活動を記録した。記録は実験チャンパー内で、頭部コネクタに記録用ケーブルを接続して実施した。授乳中の記録は、仔ラットが母ラットの乳頭を保持していることを確認して行った。離乳期以降は、各個体を個別に記録ケージにいれ、前出のペレット飼料を摂食させて筋電図活動を記録した。

### [3] 間歇的低酸素負荷

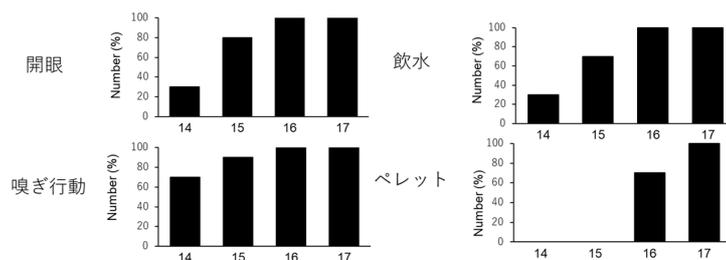
間歇的低酸素負荷は、6分間を1サイクルとして、酸素濃度を21%から5%に下げ21%に戻す過程を繰り返した。実験用チャンパー内に窒素を注入することで酸素濃度を低下させた。間歇的低酸素負荷を一日あたり3~6時間、明期に与えた。与えた期間は4~14日間とした。また、間歇的低酸素負荷の間、母児分離した条件とそうでない条件で実施した。また、対照群は、実験群と同じチャンパー内で通常酸素濃度21%で飼育した。さらに、間歇的低酸素負荷が、行動発達、パスタ摂食行動、ペレット摂食行動に与える影響を調べた。

P21のマウスに対して、上記と同様の間歇的低酸素負荷を14日間与えた。その後、脳組織のゴルジ染色を行い、神経突起やスパインの形状を評価した。

## 4. 研究成果

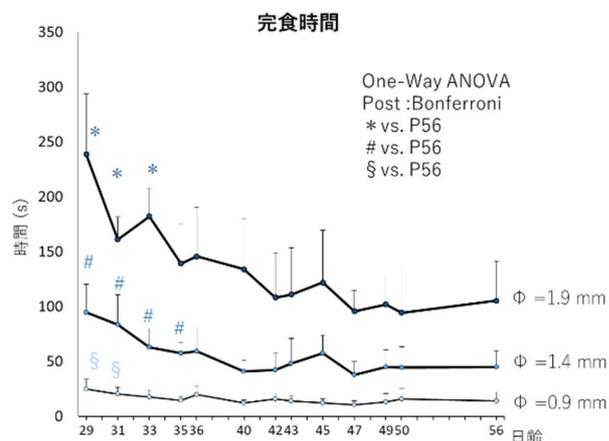
### [1] 行動テスト

(1) 行動発達：開眼、嗅ぎ行動、飲水行動はP14から開始し、P16までに全個体で認められた。食餌行動はP16から開始し、P17には全個体で認められた(右図)。



#### (2) 摂食行動

測定を開始したP18では、10匹すべての個体がパスタを完食することができなかった。P21頃から0.9mmのパスタを完食する個体が出始め、P29には全個体が与えたパスタを完食した。P29以降は、同じ日齢で、太いパスタほど完食時間が有意に長かった。また、各パスタを完食する時間は日齢とともに減少を示した(右図)。0.9mmのパスタではP31まで減少し以後平均約15秒で一定となった。また、1.4mm

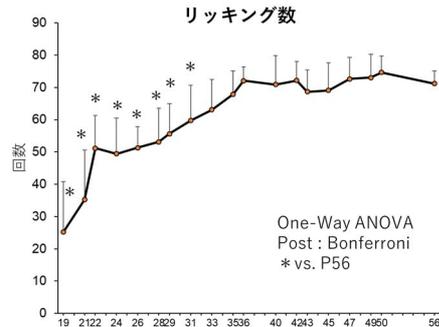


のパスタではP35まで減少し、約50秒で一定となった。1.9mmのパスタではP33まで急減し

らに、それ以降も減少し P56 では約 110 秒だった。

30 秒間の pasta 摂食量を計測すると、P21 から P49 に至るまで、pasta 摂食総量は増大した。しかし、体重当たりの摂食量は、P35 付近から横ばいもしくは減少傾向を示した。さらに、10 秒間のペレット咀嚼量も同様に記録期間中増大したが、体重当たりの摂食量は P28 ~ P35 を境に横ばいもしくは減少傾向を示した。

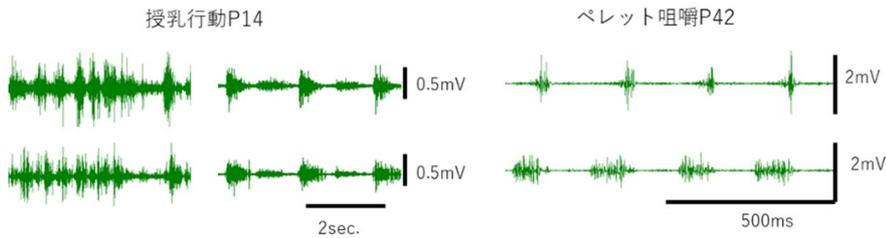
(3) リッキングテスト：測定開始日の P18 ではすべての動物がタスクを完了できなかった。P19 ~ P31 にかけてリッキング数は急増し、P35 まで微増、以降はほぼ一定となった。また、リッキング 1 回あたりの飲水量は P19 ~ P24 にかけて増加し、P35 まで微増、以降は約 0.005 g だった。



[2] 電気生理学実験

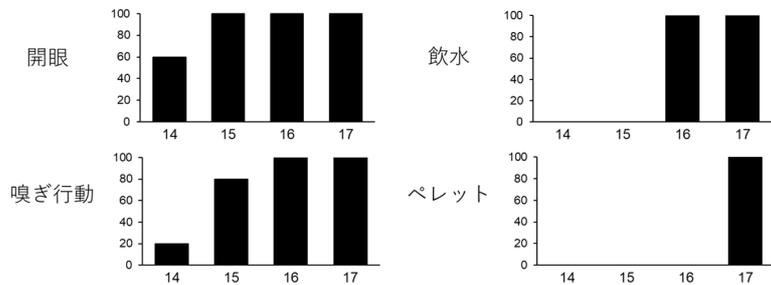
(1) 顎反射誘発実験：P21 以前には、前歯部歯根膜への電気刺激に対する顎筋の反射応答を認めない例があったが、P22 以降は全ての動物で反射応答を認めた。反射応答は、咬筋及び顎二腹筋に認められた。誘発した反射応答は、前歯部歯根膜の局所麻酔で消失した。

(2) 咀嚼筋活動記録：発達に伴う体重増加は、外科的な処置を受けなかった Naive ラットと比較して、筋電図電極及び頭部コネクタを設置した動物では低い傾向を示した。授乳行動時には、速いリズム及び遅いリズムで周期的に活動する咬筋バーストを認めた。これらの咬筋活動は、離乳後の飼料咀嚼時の咬筋活動とは異なる様相をしめした。



[3] 間歇的低酸素負荷

P14 以前に加えた間歇的低酸素負荷を与えた動物では、嗅ぎ行動や飲水、ペレット咀嚼開始する動物数がやや遅い傾向を示した。また、pasta 完食時間は、間歇的低酸素負荷を与えた群では、与えなかった群と比較して短縮したが、有意な差を認めなかった。



は、与えなかった群と比較して短縮したが、有意な差を認めなかった。

P14 以降に間歇的低酸素負荷を与えた群では、負荷を与えていない群と比較すると、30 秒間に摂食できる pasta 量は P35 から低くなる傾向を示した。また、ペレット摂食量についても同様の傾向を示した。しかし、一日あたりの間歇的低酸素負荷量によって、pasta 及びペレットの摂食量の減少に差が生じる傾向を認めた。

間歇的低酸素を負荷したマウスではコントロールに比べ、前頭前野の樹状突起長が有意に長く、樹状突起分岐の複雑性が有意に低下していた。また、神経のスパインは前頭前野に変化を認

めなかったが、海馬では有意に増加していた。これらの所見から、離乳期後の間歇的低酸素負荷が正常な神経発達を障害する可能性が示唆された。

## 結論

以上の結果から、開眼以降、数日で食餌行動や飲水行動を開始するが、離乳前は全ての動物が固形の飼料咀嚼テストや飲水行動を実施するのは難しい可能性が示された。また、全個体がこれらのテストを完了して測定可能となる時期が、テストにより異なる可能性も考えられた。また離乳後にリッキングや固形の飼料咀嚼テストを実施し摂取状態を数値化すると、どのテストにおいても P28 まで急速に変化を示し、その後 P35 から P42 頃まで緩やかな変化を示して、一定水準に収束するような経日的変化を示した。したがって、口腔機能テストを遂行するために必要な口腔機能の獲得の過程は異なるが、おおむね P35 頃までに一定水準に達する可能性が示唆された。これらの機能変化と、顎反射や咀嚼筋活動の様相、中枢神経の組織学的変化との関連付けを行うことで、離乳を境とする口腔機能発達の生理学的機序を明らかにすることが可能であると考えられる。また、発達の過程で、間歇的低酸素負荷をかけたところ、開眼以降での負荷が摂食機能の発達に影響を与える可能性が示唆されることから、今後は負荷の期間や条件を細かく設定することで、口腔機能発達のクリティカルピリオドを明らかにする研究につなげたい。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Katagiri A, Kato T	4. 巻 62(2)
2. 論文標題 Multi-dimensional role of the parabrachial nucleus in regulating pain-related affective disturbances in trigeminal neuropathic pain	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Oral Science	6. 最初と最後の頁 160-164
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2334/josnusd.19-0432	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Murakami J, Tachibana Y, Akiyama S, Kato T, Taniguchi A, Nakajima Y, Shimoda M, Wake H, Kano Y, Takada M, Nambu A, Yoshida A	4. 巻 34 (10)
2. 論文標題 Oral splint ameliorates tic symptoms in patients with Tourette syndrome	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Mov Disord	6. 最初と最後の頁 1577-1578
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/mds.27819	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Toyoda H, Kawano T, Sato H, Kato T	4. 巻 -
2. 論文標題 Cellular mechanisms underlying the rapid depolarization caused by oxygen and glucose deprivation in layer III pyramidal cells of the somatosensory cortex	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neurosci Res.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neures.2020.03.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 白石優季、加藤隆史、山城隆	4. 巻 39(12)
2. 論文標題 子どもの睡眠を取り巻く諸問題—明るい未来のために—顎顔面領域からみえる子どもの睡眠	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PROGRESS IN MEDICINE	6. 最初と最後の頁 1215-1219
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 下田麻央, 豊田 博紀, 片桐綾乃, 佐藤 元, 秋山茂久, 加藤 隆史
2. 発表標題 口腔機能発達における間歇的低酸素負荷の影響
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 豊田博紀, 加藤隆史	4. 発行年 2020年
2. 出版社 医歯薬出版株式会社	5. 総ページ数 475
3. 書名 基礎歯科生理学第7版 第18章 顎運動	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	豊田 博紀  (Toyoda Hiroki)  (00432451)	大阪大学・歯学研究科・准教授   (14401)	
研究分担者	片桐 綾乃  (Ayano Katagiri)  (40731899)	大阪大学・歯学研究科・講師   (14401)	
研究分担者	毛利 育子  (Ikuko Mohri)  (70399351)	大阪大学・連合小児発達学研究所・准教授   (14401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------