

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 1 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390549

研究課題名（和文） 咀嚼・嚥下機能の発達と障害の機序解明と制御する神経回路の可視化に向けた統合的研究

研究課題名（英文） Integrated study on mechanism of development and disorder of masticatory and swallowing function and visualization of neural circuits

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：咀嚼・嚥下機能の発達の過程を観察した結果、機能発育および発達の最適、決定的な時期といわれる臨界期は、6週齢以降に存在することが示唆された。咀嚼・嚥下機能障害発症の機序について、咀嚼・嚥下のセントラル・パターン・ジェネレータ（CPG）形成の障害は生じにくく、CPG よりも下位で障害が惹起される可能性が示唆された。顎運動と舌運動を制御する神経回路は、相互連絡し、協調して活動していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：A process of development of masticatory and swallowing function was elucidated. As a result, it was suggested that the critical period of development of those functions was beyond 6 weeks of age in mice. Regarding the mechanism of disorder of masticatory and swallowing function, the formation of an abnormal central pattern generator is unlikely to occur. Such a disturbance may be produced at the site inferior to the central pattern generator. The obtained results indicated that neural circuits controlling jaw and tongue movements have a mutual interaction.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2010年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2011年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
年度			
年度			
総計	14,000,000	4,200,000	18,200,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：矯正・小児系歯学

キーワード：咀嚼、嚥下、発達、障害

## 1. 研究開始当初の背景

近年、咀嚼や嚥下に問題を抱える児童が増えていると言われている。発育期においてよく噛む訓練がなされていないため、口腔器官

の運動ならびに感覚機能の発達に基づく咀嚼・嚥下機能が十分には獲得されない。離乳後の食べ物の軟食化が原因の一つに挙げられているが、厳密な意味での科学的エビデン

スに裏付けられている訳ではない。

また、加齢による機能低下や脳卒中に代表される脳血管障害などの後遺症による摂食・嚥下障害の患者が増加傾向にあり、歯科における新しい治療分野として、摂食・嚥下障害へのアプローチに注目が集まっている。そこで、発達期の子供の口を健康に育て、一生涯にわたり「口から食べる楽しみ」「生きる喜び」を維持するとともに、高齢化社会を迎え緊急の課題である、咀嚼・嚥下障害の病態発症機構を解明し、診断・治療へ応用する新しい歯科臨床を創成する取組が求められている。

## 2. 研究の目的

咀嚼・嚥下機能の発達と障害の機序を明らかにし、口腔運動疾患や摂食・嚥下障害発症の予防法や治療法の開発に向けた統合的研究を行うことを目的とする。

- (1) 咀嚼・嚥下機能の生後発達の過程を成育段階を追って継続的に解析する。
- (2) 咀嚼・嚥下機能の臨界期 (critical period) は存在するのか？ 時期はいつか？
- (3) 臨界期を逃してからの機能の回復 (catch-up) はどのように起こるのか？
- (4) 咀嚼・嚥下機能障害の発生機序を解明する。障害を受けやすい中枢部位はどこか？
- (5) 咀嚼・嚥下運動を制御する神経回路機構の探索・可視化を行う。

## 3. 研究の方法

(1) 全身麻酔下で、下顎運動記録装置と筋電図用電極を取り付ける。磁気センサとして、小型のホール素子を用い、4つのセンサからなるユニットを鼻骨に取り付ける。一方、標点となる磁石を下顎骨上の顎二腹筋前腹起始部に取り付け、下顎骨上の一点3次元運動(開閉・左右・前後)を記録する。筋電図を記録するために、一対の銀線電極を直視下にて、両側の咬筋と顎二腹筋に挿入する。筋電図用電極は、皮下を通して頭頂部に取り付けたコネクタに接続する。嚥下運動を計測するために、X線透視モードイメージングを行う。実験動物用3DマイクロX線CT(平成20年度納入予定)の透視モードイメージングにより、嚥下造影を行う。全行程のビデオ・レントゲン撮影を行うことにより、咀嚼・嚥下時の食塊、舌、咽頭、喉頭の運動を同時に可視化する。顎運動の解析には、顎運動の最大開口から次の最大開口までを咀嚼運動の1周期として20周期を抽出し、開口量、下顎前方移動量、下顎側方移動量、1周期の周期時間(全周期時間)の平均値を求める。舌運動の解析には、矢状断面抽出法により、舌尖部から舌根部までの運動、前頭断面抽出法により、左右辺縁間の運動を解析する。筋電図の解析には、最大開口から各筋(両側の咬筋と顎二

腹筋)筋活動開始、停止およびピークまでの時間、筋電位のピーク値、積分値を求める。

固形飼料飼育群と液状飼料飼育群に分け、離乳が開始する2週齢以降より4週齢、6週齢、8週齢、10週齢まで固形飼料飼育群と液状飼料飼育群に分け、両群のマウス間で、咀嚼・嚥下機能の発達の程度を評価する。

(2) 遺伝子改変マウスを用いて、機能障害発症の機序を解明する。GABA<sub>A</sub>受容体の膜発現率の上昇を特徴とするマウスを対象とする。咀嚼リズム発生器を変調させ、咀嚼あるいは嚥下運動に異常を生じさせる、咀嚼・嚥下中枢異常モデルとも考えられる。顎口腔機能解析により、咀嚼・嚥下時の顎運動、舌運動を計測し、顎・舌協調運動のリズムとパターンを評価する。得られた結果より、咀嚼・嚥下のセントラル・パターン・ジェネレータ(CPG)の形成に障害を生じたのか、あるいは末梢からのフィードバック機構の発達が阻害されたのかを検証する。

(3) マウスの脳幹だけの摘出標本(遊離脳幹)を作成し、一定の咀嚼・嚥下リズムを形成するニューロン集団(リズムジェネレータ)を電気刺激し、パッチクランプ法を用いて、投射する運動核ニューロンの活動電位(スパイク発火)を正確に記録し、順行性に運動ニューロンにリズムカルな咀嚼・嚥下様神経発射活動を誘発するかを観察する。遺伝子改変マウスは、リズムジェネレータ自体の形成異常が生じ、ペースメーカー的な役割を損なった可能性とリズムジェネレータは正常だが、連絡する神経回路網に異常が生じている可能性がある。後者の場合には、脳幹部の高位から低位にかけて、順次横切断を加え、リズム発生器から出力される電気信号を変調させる部位、すなわち障害を受けた中枢部位を探索する。

## 4. 研究成果

(1) 咀嚼・嚥下機能の臨界期(critical period)について、6週齢以降で、下顎運動時における咀嚼系路の安定性、すなわち変動係数が固形飼料飼育群と比較し、液状飼料飼育群で有意に大きかった。また、液状飼料で飼育する実験群に対し、液状飼料飼育終了後に固形飼料に切り替えた場合に、咀嚼・嚥下機能の回復(catch-up)がどの程度なされるか、顎運動の安定性の変化、変動係数の変化などを調べた結果、固形飼料飼育群と比較し、咀嚼系路の変動係数は、わずかに正常値に歩み寄ったが、100%の回復傾向はみられなかった。

生後特に離乳期以降の数週間は、咀嚼機能の学習にとってきわめて重要な時期であり、機能発育および発達の最適、決定的な時期と

いわれる臨界期は、6週齢以降に存在することが示唆された。逆に、この時期に噛み応えのある食べ物を与えられなければ、機能獲得のための最適な時期を逃し、後に摂食機能・嚥下機能にも大きな障害を残す原因となることも考えられた。そうした場合に、機能のキャッチアップのため、相当な訓練が必要となるか、あるいはキャッチアップ自体が不可能となることが示唆された。

(2) 遺伝子改変マウスを用いた、機能障害発症の機序解明について、GABA<sub>A</sub>受容体の膜発現率の上昇を特徴とするマウスを対象として、顎口腔機能解析を行った。口腔領域の感覚受容器からの情報は三叉神経中脳路核にインプットされるが、このニューロンには、GABA<sub>A</sub>受容体が多く発現しており、咀嚼機能の調節に何らかの役割を果たしていると考えられていた。自由運動下において、咀嚼時の顎運動、嚥下運動を計測した結果、基本的な運動パターンは健常マウスと比較して、咀嚼・嚥下リズムには影響が及ばず、不安定な咀嚼・嚥下運動が認められた。この結果、咀嚼・嚥下のセントラル・パターン・ジェネレータ(CPG)の形成に異常をきたしたわけではなく、CPGよりも下位に障害を生じたことが示唆された。

(3) 顎運動と舌運動の協調に関与する神経回路機構を解析するために、マウスの脳幹—脊髄摘出標本を作成し、三叉神経運動根と舌下神経よりガラス管吸引電極を用い、神経の複合活動電位を記録した。NMDA投与による薬物刺激で、三叉神経運動根ではバースト状の神経活動の発生間隔が長い長周期のリズム活動がまず誘発され、少し遅れて発生間隔の短い短周期のリズム活動長周期のリズム活動に重なって誘発された。

舌下神経では長周期のリズム活動のみが観察され、この活動は同側の三叉神経と舌下神経で同期していた。したがって、短周期のリズム活動を形成し三叉神経のみに出力するリズム形成回路と長周期のリズム活動を形成し三叉神経と舌下神経の両方に出力するリズム形成回路の2種類が存在すると考えられた。

標本を正中で完全に左右に分離して同様の記録を行った。その結果、三叉神経運動根では長周期のリズム活動は消失し、短周期のリズム活動のみが観察された。しかし、舌下神経では標本の左右分離後も長周期のリズム活動は出現した。これらの結果から標本の左右それぞれに長周期と短周期の2種類のリズムを形成する神経回路が存在し、長周期のリズムを形成する神経回路から三叉神経への入力には主に交叉性であるということが示唆された。

今後、脳幹—脊髄摘出標本を様々な部位で横切断を加えた状態で、三叉神経と舌下神経にリズムカルな活動が誘発されるかどうかを検索し、それぞれの神経回路の相互連絡の有無について、検証する予定である。

#### 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 22 件)

- ① Okayasu I, Komiyama O, Yoshida N, Oi K, De Laat A, Effects of chewing efforts on the sensory and pain thresholds in human facial skin, *Arch Oral Biol*, 査読有、2012 (in press)
- ② Utsumi D, Nakamura A, Matsuo K, Zereto JL, Koga Y, Yoshida N, Motor coordination of masseter and temporalis muscle during mastication in mice, *J Stomat Occ Med*, 査読有、3(4)、187-194、2011
- ③ Yoshimatsu M, Kitaura H, Fujimura Y, Kohara H, Morita Y, Eguchi T, Yoshida N, Inhibitory effects of IL-12 on experimental tooth movement and root resorption in mice, *Arch Oral Biol*, 査読有、2012 (in press)
- ④ Sirisootorn I, Hotokezaka H, Hashimoto M, Gonzales C, Luppanapornlarp S, Darendeliler MA, Yoshida N, Orthodontic tooth movement and root resorption in ovariectomized rats treated by systemic administration of zoledronic acid, *Am J Orthod Dentofac*, 査読有、2012 (in press)
- ⑤ Gonzales C, Hotokezaka H, Karadeniz EI, Miyazaki T, Kobayashi ET, Drrendeliler MA, Yoshida N, The effects of fluoride intake on orthodontic tooth movement and on orthodontically induced root resorption, *Am J Orthod Dentofac*, 査読有、139(2)、196-205、2011
- ⑥ Sirisootorn I, Hotokezaka H, Hashimoto M, Gonzales C, Luppanapornlarp S, Darendeliler MA, Yoshida N, Tooth movement and root resorption; The effect of ovariectomy on orthodontic force application in rats, *Angle Orthod*, 査読有、81: 570-577、2011
- ⑦ Kohara H, Kitaura H, Fujimura Y, Yoshimatsu M, Morita Y, Eguchi T, Masuyama R, Yoshida N, IFN- $\gamma$  directly inhibits TNF- $\alpha$ -induced osteoclastogenesis in vitro and in

- vivo and induces apoptosis mediated by Fas/Fas ligand interactions, *Immunol Lett*, 査読有、137(1-2):53-61, 2011
- ⑧ Kitaura H, Fujimura Y, Yoshimatsu M, Kohara H, Morita Y, Aonuma T, Fukumoto E, Masuyama R, Yoshida N、Takano-Yamamoto T : IL-12- and IL-18-mediated, nitric oxide-induced apoptosis in TNF- $\alpha$ -mediated osteoclastogenesis of bone marrow cells, *Calcified Tissue Int*、査読有、89(1)、65-73、2011
- ⑨ Tsujimura T, Shinoda M, Honda K, Hitomi S, Kiyomoto M, Matsuura S, Katagiri A, Tsuji K, Inoue M, Shiga Y, Iwata K, Organization of pERK-immunoreactive cells in trigeminal spinal nucleus caudalis, upper cervical cord, NTS and Pa5 following capsaicin injection into masticatory and swallowing-related muscles in rats, *Brain Res*, 査読有、12(1417)、45-54、2011
- ⑩ Matsuo E, Mochizuki A, Inoue T、Decreased intake of sucrose solutions in orexin knockout mice. *J Mol Neurosci*、査読有、43(2)、217-24、2011
- ⑪ Tsuruoka M, Tamaki J, Maeda M, Hayashi B, Inoue T、The nucleus locus coeruleus/subcoeruleus contributes to antinociception during freezing behavior following the air-puff startle in rats, *Brain Res*、査読有、1393、52-61、2011
- ⑫ Morita Y, Kitaura H, Yoshimatsu M, Fujimura Y, Kohara H, Eguchi T, Yoshida N、IL-18 inhibits TNF- $\alpha$ -induced osteoclastogenesis possibly via a T cell-independent mechanism in synergy with IL-12 in vivo, *Calcified Tissue Int*、査読有、86(3)、242-248、2010
- ⑬ Gonzales C, Hotokezaka H, Darendeliler MA, Yoshida N、Repair of root resorption 2 to 16 weeks after the application of continuous forces on maxillary first molars in rats: a 2- and 3-dimensional quantitative evaluation, *Am J Orthod Dentofac*、査読有、137(4)、477-485、2010
- ⑭ Gemba-Nishimura A, Inoue T、Properties of synaptic transmission from the reticular formation dorsal to the facial nucleus to trigeminal motoneurons during early postnatal development in rats, *Neuroscience*、査読有、166、1008-1022、2010
- ⑮ 黒瀬直子, 黒瀬雅之, 山村健介, 高辻華子, 内海 大, 山田好秋、自由行動下マウスを用いた咀嚼時筋活動様式の検討, *日咀嚼誌*、査読有、20(2)、113-120、2010
- ⑯ Zeredo JL, Kumei Y, Shibazaki T, Yoshida N, Toda K, Measuring biting behavior induced by acute stress in the rat, *Behav Res Methods*、査読有、41(3)、761-764、2009
- ⑰ Shibazaki T, Yozgatian JH, Zeredo JL, Gonzales C, Hotokezaka H, Koga Y, Yoshida N、Effect of celecoxib on emotional stress and pain-related behaviors evoked by experimental tooth movement in the rat, *Angle Orthod*、査読有、79(6)、1169-1174、2009
- ⑱ Yoshimatsu M, Kitaura H, Fujimura Y, Eguchi T, Kohara H, Morita Y, Yoshida N、IL-12 inhibits TNF- $\alpha$  induced osteoclastogenesis via a T cell-independent mechanism in vivo, *Bone*、査読有、45(5)、1010-1016、2009
- ⑲ Fujimura Y, Kitaura H, Yoshimatsu M, Eguchi T, Kohara H, Morita Y, Yoshida N、Influence of bisphosphonates on orthodontic tooth movement in mice, *Eur J Orthod*、査読有、31(6)、572-577、2009
- ⑳ Gonzales C, Hotokezaka H, Matsuo K, Shibazaki T, Yozgatian JH, Drendeliler MA, Yoshida N、Effects of steroidal and nonsteroidal drugs on tooth movement and root resorption in the rat molar, *Angle Orthod*、査読有、79(4)、715-726、2009
- 21 Gonzales C, Hotokezaka H, Arai Y, Ninomiya T, Tominaga J, Insan J, Hotokezaka Y, Tanaka M, Yoshida N、An in vivo 3D micro-CT evaluation of tooth movement after the application of different force magnitudes in rat molar, 査読有、*Angle Orthod* 79(4)、703-714、2009
- 22 Tokita K, Inoue T and Boughter Jr JD、Afferent connections of the parabrachial nucleus in C57BL/6J mice、査読有、*Neuroscience*、161、475-488、2009

[学会発表] (計 13 件)

- ① Okayasu I, Komiyama O, Yoshida N, Oi K, De Laat A, Effects of chewing efforts on the sensory and pain thresholds in human facial skin, The 27th Store Kro Club conference, Turin, Italy, May 2011
- ② Kohara H, Kitaura H, Yoshimatsu M, Fujimura Y, Morita Y, Eguchi T, Yoshida N、Effects of IFN- $\gamma$  on orthodontic

- tooth movement, The 4th international congress & the 70th annual meeting of the Japanese orthodontic society, Nagoya, October17-20, 2011
- ③ Kitaura H, Fujimura Y, Yoshimatsu M, Kohara H, Morita Y, Aonuma T, Fukumoto E, Yoshida N, Takano-Yamamoto T, IL-12- and IL-18-mediated nitric oxide-induced apoptosis in TNF- $\alpha$ -mediated osteoclastogenesis, The 4th international congress & the 70th annual meeting of the Japanese orthodontic society, Nagoya, October17-20, 2011
- ④ Yoshimatsu M, Kitaura H, Fujimura Y, Kohara H, Morita Y, Eguchi T, Yoshida N: Effects of SHIP on TNF- $\alpha$ -induced osteoclastogenesis, The 4th international congress & the 70th annual meeting of the Japanese orthodontic society, Nagoya, October17-20, 2011
- ⑤ Sirisoontorn I, Hotokezaka H, Hashimoto M, Nakano T, Yoshida N, Effect of zoledronic acid by systemic administration on orthodontically induced root resorption in ovariectomized rats, The 4th international congress & the 70th annual meeting of the Japanese orthodontic society, Nagoya, October17-20, 2011
- ⑥ 中村 文, 内海 大, 松尾恭子, 田中基大, 古賀義之, 吉田教明: 交叉咬合モデルマウスを用いた顎口腔領域における形態変化と機能発達の関連性の解明. 第46回日本顎口腔機能学会, 仙台, 5月、2011
- ⑦ Utsumi D, Koga Y, Tanaka M, Matsuo K, Nakamura A, Yoshida N, Coordination of masseter and temporalis muscles during mastication in mice, 7th International Orthodontic Congress, Sydney, Australia, Feb6-9, 2010
- ⑧ 吉田教明, 矯正患者の機能評価のガイドライン, 日本顎口腔機能学会第44回学術大会, シンポジウム「顎口腔機能評価のガイドライン」, 広島, 4月、2010
- ⑨ 中村 文, 松永淳子, 内海 大, 松尾恭子, 田中基大, 古賀義之, 吉田教明, 不正咬合モデルマウスを用いた顎口腔領域における形態変化と機能発達の関連性の解明, 第69回日本矯正歯科学会大会・第3回日韓ジョイントミーティング, 横浜, 9月、2010
- ⑩ 岡安一郎, 吉田教明, 大井久美子, 小見山 道, Antoon DeLaat, Effects of chewing efforts on the sensory and pain

perception in human facial skin, 第45回日本顎口腔機能学会, 川越, 11月、2010

- ⑪ Yoshimatsu M, Kitaura H, Fujimura Y, Kohara H, Morita Y, Eguchi T, Takano-Yamamoto T, Yoshida N: IL-12 Inhibits TNF- $\alpha$ -mediated Osteoclastogenesis via a T-cell-independent Mechanism, The 31th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, Denver, USA, Sep 11-15, 2009
- ⑫ Kohara H, Kitaura H, Fujimura Y, Yoshimatsu M, Morita Y, Eguchi T, Takano-Yamamoto T, Yoshida N & IFN- $\gamma$ -mediated Nitric Oxide Inhibits Proliferation of M-CSF-dependent Bone Marrow Macrophages, The 31th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, Denver, USA, Sep 11-15, 2009
- ⑬ 内海 大, 松尾恭子, 田中基大, 古賀義之, 吉田教明, 食品の性状の違いによるマウス咀嚼運動の変化について, 第42回日本顎口腔機能学会学術大会, 新潟, 4月、2009

〔図書〕(計1件)

- ① 郡司良律, 小嶺祐子, 寺辺やよひ, 中村文, 鈴木善貴, 竹尾健吾, 福原孝子, 福本宗子, 田中佑人, 大河貴久, 依田信裕, 渡辺一彦, 井上富雄, 瑞森崇弘, 志賀 博, 早崎治明, 丸山智章, 荒川一郎, 横山正起, 坂口 究, 最大咬合力, 咀嚼経路の安定性, および咀嚼リズムの安定性と咀嚼能率との関係について(顎口腔機能の評価, 日本顎口腔機能学会編, 徳島、82-86、2010

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://ortho.dh.nagasaki-u.ac.jp/index02.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

古賀 義之 (KOGA YOSHIYUKI)

長崎大学・医学部・歯学部附属病院・講師

研究者番号：50175329

北浦 英樹 (KITAURA HIDEKI)

長崎大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：60295087

田中基大 (TANAKA MOTOHIRO)

長崎大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：90420629

(3) 連携研究者

内海 大 (UTSUMI DAI)

長崎大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：80622604

井上富雄 (INOUE TOMIO)

昭和大学・歯学部・教授

研究者番号：70184760

井上誠 (INOUE MAKOTO)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：00303131

岡安 一郎

長崎大学・医学部・歯学部附属病院・助教

研究者番号：80346923