

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500584

研究課題名(和文) 神経栄養因子を用いた嚥下関与筋のアンチエイジングに関する研究

研究課題名(英文) A Study about anti-aging of the inferior pharyngeal muscle by neurotrophin.

研究代表者

田口 亜紀 (Taguchi, Aki)

愛媛大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：00380238

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)：下咽頭収縮筋の加齢による形態および機能変化の予防目的で、神経栄養因子であるbasic fibroblast factor(bFGF)を局所投与しその効果を検証した。具体的には加齢ラットを用いて下咽頭収縮筋にゼラチンハイドロゲルによるDrug delivery system(DDS)にbFGFを高濃度で安定的に作用させ、下咽頭収縮筋に投与し、形態学的な変化、筋機能低下予防に関する研究を行った。組織学的検討、神経下装置の観察の結果、bFGF投与により、輪状咽頭筋の方が筋機能低下の予防効果が高いことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We studied about the protection of functional deterioration of deglutition decline by basic fibroblast factor(bFGF). Specifically, we used Drug delivery system(DDS) with gelatine hydrogel and gave it to inferior constrictor muscle of pharynx and performed a morphologic change, a study about the myofunction drop prevention.

I triggered bFGF at high density to inferior constrictor muscle of pharynx using an aging rat stably in Drug delivery system(DDS) with the gelatine hydrogel and gave it to inferior constrictor muscle of pharynx and performed a morphologic change, a study about the myofunction drop prevention. As a result of histologic examination, observation of the nerve lower device, it was suggested that cricopharyngeus muscle was higher in the protective efficacy of the myofunction drop by the bFGF dosage.

研究分野：複合領域

科研費の分科・細目：人間医工学 リハビリテーション科学・福祉工学 老年学

キーワード：アンチエイジング 下咽頭収縮筋 神経栄養因子

1. 研究開始当初の背景

近年、様々な神経栄養因子を用いたアンチエイジングの研究が行われている。申請者も、神経栄養因子に着目し、bFGFによる下咽頭収縮筋の筋力低下予防効果についての研究を進めることで、嚥下障害患者の減少につなげることを目標とした。

高齢者社会を迎えた現在、死因の一つとして嚥下性肺炎が注目されている。高齢者における嚥下障害発症メカニズムの解明とその対策は急務である。加齢に伴う嚥下機能の低下の原因としては、神経系の機能低下、咽喉頭の解剖学的構造の変化、嚥下関与筋の機能障害など様々なものが考えられているが、そのメカニズムについては不明な点も少なくない。国内でも様々なアンチエイジングの研究が近年積極的に行われるようになってきた今、申請者は嚥下に関与する筋の加齢による機能低下に着目して、形態学的側面からアプローチを行ってきた。その過程において嚥下関与筋、特に下咽頭収縮筋の形態変化が嚥下機能の変化と密接に関わっていることを明らかにしてきた。(Taguchi A, et al, Dysphagia, 2004) (Hyodo M, et al, Acta Otolaryngol, 2005) (Hyodo M, et al, Laryngoscope, 2007)

下咽頭収縮筋は咽頭と食道との境界に位置しており、頭側の甲状咽頭筋と尾側の輪状

咽頭筋の、二つの筋の総称である。甲状咽頭筋は嚥下時に収縮し非嚥下時には弛緩する。一方、輪状咽頭筋は嚥下時に弛緩し非嚥下時には持続収縮する極めて対照的な筋活動を行う。この両筋は嚥下において極めて重要な役割を担っており、当教室ではこれまでに甲状咽頭筋と輪状咽頭筋の形態学的特長や両筋の様々な組織化学的特性相違を明らかにしてきた。(Hyodo M, et al, Acta Otolaryngol, 1998) この両筋の機能障害は嚥下障害に直結することから、下咽頭収縮筋の機能障害の予防が可能ならば高齢者の嚥下障害の治療法の開発につながると考え、この研究を計画するに至った。

筋線維の生理学的機能は筋線維の微細構造や筋線維タイプと密接に関連しており、筋線維の機能変化を形態学的変化の点から定量的に評価することは極めてユニークである。本研究では、近年筋線維の加齢変化との可能性が注目されている神経栄養因子を局所投与することで、筋線維の加齢変化を予防しようとする点にも特色がある。この際、bFGFが局所で長時間、十分な生理活性を有して作用するようゼラチンハイドロゲルによるDDSを用いる点も、本研究の大きな特色である。このように本研究は加齢による嚥下機能を予防しようとする独創的な研究であり、bFGF

投与による下咽頭収縮筋の加齢変化の予防が証明されれば、高齢者の嚥下障害の治療に有用な臨床的知見を提供できると考えられる。本研究が嚥下機能におけるアンチエイジングの第一歩となることは必至であると考えた。

2. 研究の目的

前研究までに、嚥下関与筋である下咽頭収縮筋筋線維の加齢変化を走査型電子顕微鏡により詳細に観察し、その形態を画像解析手法により定量的に評価することはできた。本研究では、神経栄養因子による下咽頭収縮筋の加齢変化予防に関する研究を中心に行う。下咽頭収縮筋の加齢による形態および機能変化の予防目的で、神経栄養因子である basic fibroblast factor を局所投与しその効果を検証する。近年四肢筋を用いた研究で、加齢による筋萎縮の原因の一つが神経栄養因子のひとつである**インシュリン様成長因子-1 (IGF-1)**の減少によるものと報告がある。(Borst SE, et al, Endocrine, 1997) また、同じ神経栄養因子の一つである**bFGF**においても、筋組織に作用し細胞活性を持つ星状細胞の分化、増殖に関与するといわれている (Sheehan, S. M, et al, 1999)。これらの神経栄養因子を用いた研究は数多くなされているが、加齢モデルに神経栄養

因子を投与し走査型電子顕微鏡で観察した報告はまだない。そこで今回この研究を行うこととした。具体的には下咽頭収縮筋にゼラチンハイドロゲルによる **Drug delivery system (DDS)** を用いて、bFGF を高濃度で安定的に作用させ、上記で明らかにした下咽頭収縮筋の形態学的変化に違いがあるかどうかを検討する。前回まで IGF-1 における研究を進めていたが、IGF-1 除放化のゼラチンハイドロゲルが入手困難となったため、今回は bFGF を用いて研究を行うこととした。

3. 研究の方法

成熟群ラットでの検討

1) bFGF 投与モデルの作製

まず成熟群のラットを用いて bFGF 投与モデルの作製の確立を行う。塩酸ケタミンの筋肉内注射による麻酔後、頸部皮膚切開を行い、手術用実態顕微鏡 (申請備品) 下に下咽頭収縮筋を露出する。筋に持続的に薬剤を投与するため治療群は 1 μ g/day の bFGF 含有のゼラチンハイドロゲルを 3 週間、2 μ g/day の bFGF を 2 週間、下咽頭収縮筋上に留置する。対照群はそれぞれ生理食塩水含有のゼラチンハイドロゲルを 2、3 週間持続投与する。

2) bFGF 投与下咽頭収縮筋モデルの組織学的検討

ペントバルビタールにて安楽死処置後、生

物顕微鏡を用いて下咽頭収縮筋を一塊に摘出する。前述の方法で甲状咽頭筋および輪状咽頭筋ごとの筋線維タイプ構成比を算出し、対照群との構成比の違いを検討する。併せて、筋線維断面積、筋線維数を計測し、検討する。

3) bFGF 投与下咽頭収縮筋モデルの神経下装置の観察

ラットにペントバルビタールを腹腔内投与し、安楽死処置後、速やかに喉頭、下咽頭収縮筋、頸部食道を一塊に摘出し、実体顕微鏡下（現有備品）に両側の甲状咽頭筋・輪状咽頭筋を採取。筋をリン酸緩衝グルタールアルデヒドに浸漬固定した後、1%オスミウム酸にて30分間後固定。次いで8N塩酸で30分処理し、筋内結合組織を除去する。続いて、脱水、臨界点乾燥し、白金蒸着した後、走査型電子顕微鏡（日立S-800A）（現有備品）で筋線維上に存在する神経下装置の1次シナプスおよび2次シナプスの形状を観察する。治療群と対照群において、1次シナプスの迷路型（次ページ図 a）、陥凹型（次ページ図 b）の形態の変化について検討し、その割合を算出する。神経下装置の走査型電子顕微鏡画像をパーソナルコンピューターに取り込み、画像解析ソフトを用いて2次シナプス面積と1次シナプス面積の比、及び2次シナプスの幅と長さの比を算出する。

加齢群ラットでの検討

1) bFGF 投与加齢群モデルの作製

加齢群には24ヶ月齢のラットを用いる。塩酸ケタミンの筋肉内注射による麻酔後、頸部皮膚切開を行い、手術用顕微鏡（現有備品）下に下咽頭収縮筋を露出する。筋に持続的に薬剤を投与するため治療群は1 μ g/dayのbFGF含有のゼラチンハイドロゲルを3週間、2 μ g/dayのbFGFを2週間、下咽頭収縮筋上に留置する。対照群はそれぞれ生理食塩水含有のゼラチンハイドロゲルを2、3週間持続投与する。

2) bFGF 投与下咽頭収縮筋モデルの組織学的検討

ペントバルビタールにて安楽死処置後、生物顕微鏡を用いて下咽頭収縮筋を一塊に摘出する。前述の方法で甲状咽頭筋および輪状咽頭筋ごとの筋線維タイプ構成比を算出し、対照群との構成比の違いを検討する。併せて、筋線維断面積、筋線維数を計測し、検討する。

3) bFGF 投与下咽頭収縮筋モデルの神経下装置の観察

ペントバルビタールにて安楽死処置後、喉頭、下咽頭収縮筋頸部食道を一塊に摘出し、実体顕微鏡下に両側の甲状咽頭筋・輪状咽頭筋を採取する。前述の方法にて走査電子顕微鏡での神経下装置を観察し、その形態を定量的に評価して対照群と比較検討した。

これらの結果と bFGF 投与成熟群の比較検討

もあわせて行った。

4. 研究成果

成熟群、加齢群共に bFGF 投与したモデルを作製することに成功し、神経下装置を観察することができた。

組織学的検討、神経下装置の観察の結果から、bFGF 投与により、甲状咽頭筋に比べ、輪状咽頭筋の方が筋機能低下の予防効果が高いことが示唆された。このことより、神経栄養因子を投与することにより、下咽頭収縮筋のアンチエイジングが期待できると思われた。

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[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

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田口 亜紀 (Taguchi, Aki)

愛媛大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号 : 00380238

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号 :

()

研究者番号 :

()

研究者番号 :

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号 :