

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：35308

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500630

研究課題名(和文) 健常人嚥下遅延モデルの作成とその有用性の検討

研究課題名(英文) A model that causes a decrease in the swallowing function in healthy people

研究代表者

水谷 雅年 (Mizutani, Masatoshi)

吉備国際大学・保健医療福祉学部・教授

研究者番号：30108170

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：食事によって嚥下能が低下することを見つけ、健常人で行える嚥下遅延モデルを作成した。この満腹による嚥下抑制は血糖値の上昇によるのではなく、胃の伸展によって引き起こされることを明らかにした。高齢者の嚥下機能低下患者で改善効果のある黒コショウの刺激はこのモデルでも有効であった。ラットに於いて満腹による嚥下抑制の中枢機序が調べられ、満腹物質であるグルカゴン様ペプチド1(GLP-1)の延髄背側複合核群への微量投与で反射性嚥下を抑制し、この作用はGLP-1拮抗薬によって、延髄背側部の内側孤束核の局所破壊によって消失した。従って満腹による嚥下抑制は延髄背側部の内側孤束核が関与すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：It found that satiety by diet lowers the swallowing function. The advantage of this was to create a swallowing delay model which can perform in a healthy person. Swallowing suppression by the satiety rather than due to the rise of the blood sugar was revealed to be caused by stretching of the stomach. Stimulation of black pepper with improvement in swallowing function decline elderly patients were also effective in this model. In anaesthetized rats, it was investigated central mechanisms of swallowing suppression by satiety. Microinjection of glucagon like peptide-1(GLP-1) into the dorsal vagal complex (DVC) inhibited swallowing induced by central stimulation of the superior laryngeal nerve. The inhibitory response was attenuated by treating exendin (5-39), a GLP-1 receptor antagonist, and by electrical lesion of medial NTS, but not commissural part of the NTS and the area postrema. These results suggest that GLP-1 inhibits reflex swallowing via medial NTS in the dorsal medulla.

研究分野：生理学

キーワード：嚥下障害 嚥下 満腹物質 摂食 GLP-1 黒コショウ カプサイシン 香り

1. 研究開始当初の背景

嚥下は、生命にとって最も基本的な事項であるエネルギー摂取の初期段階の行動であり、これが円滑に行われないと誤嚥を生じ生存に重大な危機が生じる。嚥下障害を持つ患者が食事開始後しばらくはスムーズに摂食していても、時間とともに摂食するスピードが低下し、むせを生じる現象がみられる。また健常人であっても食事時間が経過するに従って、胸のつかえや飲み込みにくさを感じることは通常である。これらのことから嚥下機能が満腹感と深く関連することが予想される。

加齢に伴う嚥下能低下は誤嚥性肺炎の危険因子となり、超高齢社会を迎えた現在、社会的に大きな問題となっている。また加齢は生理学的に神経機能の低下をもたらし、口腔・咽頭・食道粘膜の組織学的変化、筋緊張の低下、靱帯の緩みなどを招き、その結果嚥下の予備能力が低下するといわれている。従って、高齢者の嚥下障害に対しては、加齢による嚥下機能の障害様式を理解した上で、的確な診断と治療を行うことが必要である。しかし、嚥下機能低下に対する予防法あるいは治療法を検討する際に嚥下障害者を対象とすることは危険な場合がある。

そこで健常人で嚥下遅延を起こさせるモデルを考案し、その嚥下遅延が起こるメカニズムを調べた。また臨床現場で嚥下遅延を改善するといわれているカプサイシン、黒コショウの香り(侵害刺激)がこのモデルでも嚥下遅延を改善するかどうかを検討した。

2. 研究の目的

嚥下障害者の嚥下機能を改善するためのtherapyの有効性をテストする簡便なモデルを考案するのが全体構想である。

(1) 健常人における実験

本研究では健常人被験者で満腹により嚥下能の減弱したモデル(健常人嚥下能減弱モデル)を作成する。

この嚥下能減弱モデルにおける、満腹による嚥下能低下の要因を健常人で明らかにする。

嚥下障害者で嚥下改善効果が認められている黒コショウの刺激やカプサイシン含有フィルム摂取刺激(いずれも侵害刺激)を用いて、健常人の満腹時嚥下機能減弱を回復させるかどうかを明らかにし、モデルの有効性を検証する。

食事による嚥下間隔の延長と自律神経活性の相関を調べる。

(2) ラットにおける実験

実験動物(ラット)を用いて満腹による嚥下能低下の神経生理学的基盤を明らかにする。

満腹によって増えると考えられるグルカゴン様ペプチド-1(GLP-1)の延髄内微量注入によって反射性嚥下を起こす部位を同定する。

GLP-1受容体拮抗薬を用いて、GLP-1受容体が嚥下を抑制することを明らかにする。

延髄背側迷走神経複合核群正中部の部分破壊することによって、満腹による嚥下抑制経路を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 健常人での検討

実験は健常若年成人で行った。被験者には事前に、実験開始3時間前までに食事を終わらせるように指示し、安定した結果が得られるよう反復嚥下のトレーニングを行わせた。空嚥下の動きは顎舌骨上筋群上に筋電図導出ディスプレイ電極(ブルーセンサーN-00-S、Ambu社)と喉頭隆起上にストレインゲージトランスジューサ(F-12 IS、スターメディカル社)を装着し、パワーラブシステム(ML846、ADInstrument社)を介してパーソナルコンピュータに記録した。

空嚥下は1分間可能な限り速く行うように指示した。嚥下開始直後は唾液分泌の影響を受けるので、それを除くため最初の25秒間

のデータは捨てた。嚥下間隔の計測は嚥下開始 25 秒から 45 秒の間とした。嚥下間隔を求める嚥下の各タイミングは喉頭隆起の動きから、嚥下の期間を決め、その間の筋電図の最大振幅時とした。数値データは平均値 ± 標準偏差で示した。

本研究は吉備国際大学倫理審査委員会の承認を得て行った（承認番号 12-05）

と の実験に於いて、被験者は健常若年成人のうち嚥下の安定した女子学生 7 名（ 20.9 ± 0.4 歳）を選び実験を行った。食事はコンビニで購入した弁当（唐揚げ弁当、チキン南蛮弁当など）また弁当の代わりに、ブドウ糖溶液 225mL（トレーラン G75、味の素社）、人工甘味料の甘みのある無糖ミルクティ（午後の紅茶ヘルシーミルクティ、キリンビバレッジ社）で作成した寒天 300mL および寒天で固めない無糖ミルクティ液（人工甘味料：アセスルファム K、スクラロース、ステビア）300mL の 4 種が用いられた。

空嚥下の計測は食事の前、食事の直後、食後 30 分、食後 2 時間の計 4 回行った。

また、1 分間の空嚥下の直後に指尖部にディスプレイ採血針を穿刺し、微量の血液から血糖値を測定（グルテストエブリ、アークレイ社）した。各食事の直後に満腹度を 100mm の線上にマークをしてもらい、VAS (visual analog scale)として表した。

統計処理は 1 回目の測定結果とその後の測定結果を使用し、一元配置分散分析反復測定を行い、有意差を認めたものを多重比較（Student-Newman-Keuls 法）を用い検定した。有意水準は $P < 0.05$ とした。

の実験に於いて、被験者は健常若年成人 34 名に寒天を摂取してもらった。そのうち安定した嚥下遅延を認めたもの、男性 8 名、女性 4 名の合計 12 名に対して各 3 回実験を行った。1 回目は寒天を摂取してもらい、摂食前 2 回、摂食直後、摂食 30 分後にそれぞれ空嚥下を 1 分間可能な限り速く行わせた。2

回目はカプサイシン、3 回目は黒コショウを作用させた。

食事による嚥下遅延は寒天の摂取で行った。寒天はブドウジュース（小岩井純水ブドウ、キリンビバレッジ社）を水で倍希釈した液を寒天で固めて作った。寒天 500mL を 10 分かけて食べてもらった。カプサイシンはカプサイシン含有フィルム（カプフィルム、ミコー B 社）を 1 枚経口投与して行った。黒コショウはアロマ精油を用い、綿棒に 2 滴落とし寒天摂食中嗅いでもらった。

統計処理は SPSS ver.22 を用い、それぞれの嚥下間隔に対して二元配置分散分析を行った後、Bonferroni の多重比較を行った。有意水準は $P < 0.05$ とした。

寒天摂取によって嚥下遅延が起こりやすい人と起こりにくい人が見られることから、健常成人 14 名に対して、嚥下遅延の程度と被験者の自律神経活性との関係を調べた。自律神経活性はパルスアナライザー（TAS9 view, YKC）を用い、嚥下実験開始前に計測した。

(2) ラットでの検討

実験にはウレタン・クロラロース麻酔下の SD 系雄性ラットを用いた。上喉頭神経中枢端を双極プラチナイリジウム線電極を用い電気刺激（20 Hz、20 秒間）することにより反射性嚥下を惹起した。刺激パルスは幅 0.1-0.3 msec、強度 0.1-0.3 mA の範囲で薬液注入前の嚥下回数が 10 回から 20 回の間になるように調整した。舌骨上筋群に刺入した双極釣針電極から導出した筋電図により嚥下運動を同定した。刺激開始時点から初回の嚥下筋電図波形のピークまでの時間を計測し潜時として示した。

リングル液に溶解した GLP-1 を DVC の異なる 2 部位、すなわち嚥下起動神経群の存在する孤束周辺の部位（外側部）、または最後野と孤束核を含む部位（正中部）のいずれかに微量注入した。GLP-1 受容体拮抗薬の効果を

調べるために、exendin (5-39)を前投与し、GLP-1 注入の効果を調べた。exendin (5-39) および GLP-1 とともに正中部に注入した。M-DVC 領域のどの部位に GLP-1 が作用し、反射性嚥下を抑制したか明らかにするため、M-DVC 領域内の異なる 3 部位を破壊した。最後野は吸引除去、孤束核交連部は電気焼灼、孤束核内側部は電気焼灼した。破壊後に、リンゲル液に溶解した GLP-1 (20 pmol) を M-DVC に 60 nL 微量注入した。

実験中ラットを脳定位固定装置に固定し、直腸温を 36.0-36.5 に維持した。

結果の解析には、GLP-1 投与前後の刺激期間中の嚥下回数と潜時を用いた。数値データは平均値 ± 標準誤差で示した。試薬投与の効果の有無は、投与 5 分前と投与 10 分後の値を Dunnett 法を用いて比較検討した。多重比較には ANOVA を用い、post hoc テストには Student-Newman-Keuls 法を用いた。

4. 研究成果

(1) 健常人嚥下遅延モデルの作成とその有用性の検討

市販の弁当の摂取 (満腹度 VAS: 83 ± 11) により、食前の嚥下間隔 4.86 ± 2.06 秒が食直後に於いて 7.64 ± 4.63 秒となり、有意な延長 (P<0.05) がみられ、30 分後、2 時間後と摂食前の嚥下間隔に徐々に戻った (図 1)。このことより若年健常人に於いても、

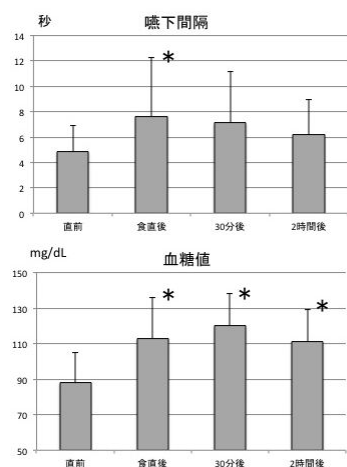


図1 市販の弁当摂取による嚥下間隔と血糖値の変化
*: p<0.05

食事により嚥下遅延を起こすことができることが明らかとなった。

嚥下遅延の生理的機序

食事による嚥下間隔と血糖値との関連を調べるため、それぞれの嚥下テストの直後に血糖値を計測した。食事前の血糖値は 87.6 ± 7.2mg/dL であったが、食直後 113.1 ± 23.4 mg/dL、30 分後 120.3 ± 17.7 mg/dL、2 時間後 110.6 ± 18.3 mg/dL といずれも食事前の値より有意に増加 (P<0.05) していた (図 1)。

ブドウ糖溶液の摂取 (満腹度 VAS: 43 ± 24) においては、血糖値は食前 83.6 ± 9.2 mg/dL から食直後では上がり、30 分後 139.3 ± 22.3mg/dL、2 時間後 112.4 ± 15.7 mg/dL といずれも有意に増加 (P<0.01) した。しかし嚥下間隔の増加はいずれの時期に於いてもみられなかった。

寒天摂取 (満腹度 VAS: 64 ± 18) において、食直後に於いてのみ、嚥下間隔が有意に増加した (P<0.05)。しかし血糖値はいずれの時期に於いても変化はみられなかった。

寒天を作るときに使用した人工甘味料で甘みのある無糖ミルクティの摂取 (満腹度 VAS: 38 ± 14) に於いては嚥下間隔に変化はみられなかった。同時に測定した血糖値の変化は有意な減少を示した。これは水分の吸収により血液が薄められた結果と考えられる。

これらの実験結果から食事による嚥下間隔の延長は血糖値の変化と時系列的に一致せず、血糖値の上昇によって引き起こされているとは考えにくい。甘みによる味覚の刺激もブドウ糖溶液、無糖ミルクティ液で嚥下間隔の延長がみられなかったので考えにくい。一方寒天摂取は血糖値を変えず、弁当摂取と同様に嚥下間隔の延長を起こした。寒天も弁当も固形物であり、胃から十二指腸に排出されるのに時間がかかり、胃の伸展効果が高い。また VAS による満腹度も高く、胃の伸展による満腹感が嚥下の遅延を引き起こしているものと思われる。

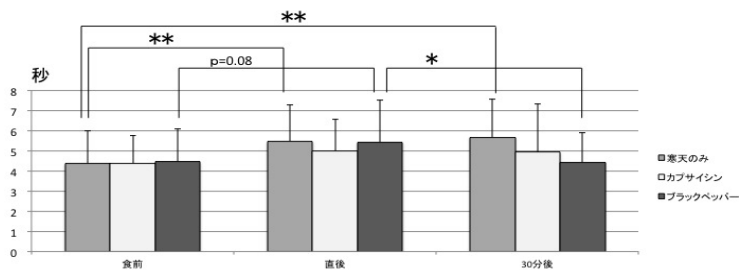


図2 寒天摂取における嚥下遅延に対するカプサイシンとブラックペッパーの効果
*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$

このモデルの有用性の検討

寒天 500mL の摂取前の嚥下間隔は 4.38 ± 1.62 秒であったが、摂取直後で 5.49 ± 1.83 秒、摂取 30 分後で 5.67 ± 1.90 秒となった。寒天摂取前と比べ摂食直後、摂食 30 分後において有意に嚥下間隔の延長がみとめられた ($P < 0.01$)。カプサイシン投与群では寒天摂取前で 4.36 ± 1.40 秒、摂取直後で 4.99 ± 1.58 秒、摂食 30 分後で 4.95 ± 2.38 秒となり、それぞれの嚥下間隔に有意な差は認められなかった。黒コショウ投与群では摂食前 4.45 ± 1.63 秒、摂食直後で 5.44 ± 2.08 秒、摂食 30 分後で 4.44 ± 1.49 秒となり、摂食前と比べ摂食直後に嚥下間隔の延長の傾向が見られた ($P = 0.08$)。また摂食直後と比べ摂食 30 分後との間に有意な嚥下間隔の短縮が認められた ($P < 0.05$)。従って黒コショウ投与群で寒天摂取による嚥下遅延の改善がみられた (図 2)。

カプサイシンも黒コショウも高齢者の嚥下障害患者に改善効果があるとして利用されている。今回の実験で、健常人嚥下遅延モデルにおいて黒コショウでは改善効果が得られたが、カプサイシンでは得られなかった。この原因として今回の実験ではカプサイシンは寒天摂取の直前にカプサイシン含有フィルムを 1 枚 (単回) 摂取して行っており、複数回摂取 (毎食前に摂取して 1 ヶ月間) による蓄積効果が必要であったと考えられる。

嚥下遅延と自律神経活性

寒天摂取による嚥下遅延の程度と自律神経指標 (脈拍数、交感神経活性、副交感神経

活性、自律神経活動量、自律神経活動バランス) との間に相関はみられなかった。

本研究により、健常人嚥下遅延モデルの有用性の一部が示唆された。さらにより良いモデルに改良し、嚥下機能低下に対する予防法あるいは治療法を、危険を伴う可能性のある嚥下機能低下者を用いずとも健常者で検討できるものにして行きたい。

(2) ラットでの結果

GLP-1 延髄内微量注入の反射性嚥下におよぼす効果:

GLP-1 を DVC に微量注入した。DVC の異なる 2 部位に GLP-1 を微量注入し、嚥下におよぼす効果を調べた。GLP-1 投与 5 分前と GLP-1 投与 10 分後の反射性嚥下回数と初回嚥下潜時を比較した。その結果、正中部に注入したときには、GLP-1 投与 5 分前と比較して嚥下回数の有意な減少と初回嚥下潜時の有意な延長が観察された。外側部に注入したときには、嚥下回数および初回嚥下潜時に有意な差が認められなかった。正中部への溶媒の微量注入は、嚥下回数および初回嚥下潜時共に有意な変化を生じなかった。試薬投与 10 分後の変化量では正中部に溶媒を注入した群、正中部に GLP-1 を注入した群、外側部に GLP-1 を注入した群の三群で嚥下回数、初回嚥下潜時ともに有意な差を示した。正中部に GLP-1 を注入した群と正中部に溶媒を注入した群の間に嚥下回数、初回嚥下潜時ともに変化量に有意な差が認められ、正中部に GLP-1 を注入した群と外側部に GLP-1 を注入した群の間

にも嘔下回数、初回嘔下潜時ともに変化量に有意な差が認められた。

GLP-1 受容体拮抗薬の前投与の効果

GLP-1 受容体拮抗薬の効果を調べるために、exendin(5-39)の前投与または溶媒の前投与後の GLP-1 注入の効果を調べた。その結果、溶媒投与後の GLP-1 注入に比して、exendin(5-39)投与後の GLP-1 注入時の方が、有意に嘔下頻度は高くなり嘔下潜時は短くなった。

延髄背側迷走神経複合核群正中部の部分破壊の効果

M-DVC の異なる 3 部位を部分破壊した後、GLP-1 を M-DVC に微量注入した。GLP-1 投与 5 分前と GLP-1 投与 10 分後の反射性嘔下回数と初回嘔下潜時を比較した。その結果、孤束核内側部破壊群では GLP-1 の効果が嘔下回数、初回嘔下潜時ともに消失した。一方、最後野除去群では、嘔下回数が有意に減少し、初回嘔下潜時の有意な延長が認められ、GLP-1 の効果が消失しなかった。さらに、孤束核交連部破壊群でも、嘔下回数が有意に減少し、初回嘔下潜時の有意な延長が認められ、GLP-1 の効果が消失しなかった。すなわち、最後野除去群と孤束核交連部破壊群では破壊による効果が認められなかった。試薬投与 10 分後の変化量では、無破壊群、最後野除去群、孤束核交連部破壊群、孤束核内側部破壊群の 4 群間においては、嘔下回数と初回嘔下潜時はともに有意な差を示した。孤束核内側部破壊群は無破壊群、最後野除去群、孤束核交連部破壊群と比べて嘔下回数の変化量に有意な差が認められた。さらに、孤束核内側部破壊群は無破壊群、最後野除去群、孤束核交連部破壊群と比べて初回嘔下潜時の変化量に有意な差が認められた。

これらのことから、GLP-1 は延髄背側部の内側孤束核ニューロンを介して嘔下反射を抑制していることが明らかとなった。

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 4 件)

1. Kobashi M, Mizutani S, Fujita M, Mitoh Y, Shimatani Y, and Matsuo R. Central orexin inhibits reflex swallowing elicited by the superior laryngeal nerve via caudal brainstem in the rat. *Physiology & Behavior*, 査読有り, 30, 2014, 6-12, DOI 10.1016/j.physbeh.2014.03.009
2. 水谷諭史, 小橋基, 島谷祐一, 藤田雅子, 美藤純弘, 水谷雅年, 松尾龍二. GLP-1 中枢投与による反射性嘔下抑制を惹起する部位の同定. *日本味と匂学会誌*, 査読有り, 21, 2014, 245-248. なし
3. Morishita M, Mori S, Yamagami S, and Mizutani M. Effect of carbonated beverages on pharyngeal swallowing in young individuals and elderly inpatients. *Dysphagia*, 査読有り, 29, 2014, 213-222. DOI 10.1007/s00455-013-9493-6
4. 水谷諭史, 小橋基, 藤田雅子, 美藤純弘, 島谷祐一, 松尾龍二. GLP-1 中枢投与による反射性嘔下修飾作用. *日本味と匂学会誌*, 査読有り, 20, 2013, 237-240.

[学会発表](計 2 件)

1. 水谷諭史, GLP-1 は孤束核内側部を介して反射性嘔下を抑制する. 第 92 回日本生理学会大会. 2015 年 3 月 21 日~23 日, 神戸国際会議場(兵庫県神戸市)
2. 水谷諭史, GLP-1 中枢投与による嘔下反射におよぼす作用. 第 91 回日本生理学会大会, 2014 年 3 月 16 日-18 日, 鹿児島大学(鹿児島県鹿児島市)

[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]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水谷 雅年 (MIZUTANI, Masatoshi)
吉備国際大学・保健医療福祉学部・教授
研究者番号: 30108170

(2) 研究分担者

小橋 基 (KOBASHI, Motoi)
岡山大学・医歯(薬)学総合研究科
研究者番号: 80161967

(3) 連携研究者

なし()