

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350649

研究課題名(和文) 系統別障害モデルを用いた感覚刺激による嚥下障害改善法の体系的評価

研究課題名(英文) Investigation of swallowing dysfunction after sensory stimulation in experimental animal models

研究代表者

狩野 充浩 (Kano, Mitsuhiro)

東北大学・歯学研究科・大学院非常勤講師

研究者番号：10419236

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,800,000円

研究成果の概要(和文)：筋萎縮症モデルマウスでは、頸部の筋肉に異常が発見された。一部の喉頭に付着する筋にエオジンの濃染が認められ、筋線維の萎縮も観察された。この筋肉は輪状甲状筋であることが同定できた。また輪状甲状筋の運動終板におけるCGRPの発現は非常に強く、この筋での運動終板の変性が確認された。一方、感覚神経の分布は正常マウスの分布と同様であった。また、ALSモデルや加齢マウス及びラットの軟口蓋、咽頭及び喉頭粘膜におけるP感覚及び運動終板の分布は正常動物と大きな変化は認められなかった。本研で観察された筋線維の萎縮や運動終板の変性の原因の同定は不十分であり、今後は、さらなる検討が必要とされる。

研究成果の概要(英文)：Immunohistochemistry for PGP 9.5, CGRP, TRP channels was performed on the rat and mouse soft palate, epiglottis and pharynx. Motor nerve endings contained PGP 9.5 and CGRP, whereas Sensory nerve endings contained CGRP, TRPV1 and TRPM8. CGRP-containing motor endplates and CGRP-immunoreactive density were increased in oral, pharyngeal and laryngeal muscles of dmu mice. In a laryngeal muscle, the atrophy of muscle fibers could be detected and the density of cell nuclei in the musculature increased. However, distribution of TRPV1 and TRPM8 was similar in wild type and dmu mice. Distributional change of PGP 9.5, CGRP, TRP channels was obscure in ALS models and model animals of aging. Transection of vagal and glossopharyngeal nerves decreased the number of motor and sensory nerve fibers. Degeneration of sensory and motor nerve fibers soft palate, epiglottis and pharynx may be associated with swallowing dysfunction in experimental animals.

研究分野：総合領域

キーワード：摂食嚥下 リハビリテーション

1. 研究開始当初の背景

我々は毎日特に何かを特別に意識するわけでもなく何気なく口から食事をしている。口から食物を摂取する重要性を十分に認識している人がどれほどいるであろうか？今日の高齢化社会において年を取ってから口からおいしく食べられることは生活の質(QOL)という点からも大変大きな意義を持つ。その意味で嚥下機能は非常に重要な機能の1つである。一方で脳血管疾患等により嚥下障害が生じてしまった途端に口から食物を摂取することができなくなってしまう。身体の機能は一端長期間損なわれてしまうと後で取り戻すことは非常に難しい。いわゆる廃用性萎縮が起こるからである。

嚥下に関わる器官は非常に多岐にわたり、嚥下障害の原因も様々である。嚥下障害の患者に対しては近年医師、歯科医師、作業、理学療法士、歯科衛生士など複数職種の医療者がチームで対応するチームアプローチが定着してきており、各医療者が専門的な知識を元に対処することが可能になっている。実際の臨床の場においても口から食べることの重要性は見直されてきており、脳血管疾患の患者の急性期の段階から口から食物を摂取する訓練を開始するケースもある。他にも食物の性状や体位を工夫したり、感覚刺激を利用したり様々な方法が用いられている。一方基礎の分野においても、様々な方法で嚥下機能の詳しい動態が解明されてきた。我々は今まで嚥下に関わる器官の組織学的検討として、ヒト剖検症例を用いて喉頭蓋弾性軟骨が加齢に伴い特に男性において著明な石灰化が生じることを解明し、超薄膜磁界センサを用いた磁気式の生体内モーションキャプチャシステムを使用して嚥下に関わる舌骨、喉頭蓋の詳細で3次元動的な動きの検討や神経機能を加味した誤嚥モデルラットの検討を行なった。実際に臨床において嚥下障害の改善に使われている手法には様々あるが、今回我々はその中で感覚刺激という点に注目した。近年感覚刺激を用いた嚥下障害の改善法は徐々にいくつかの方法が用いられており、一定の成果を上げている。しかし各疾患別の詳しい病態や咽頭喉頭部領域の知覚神経終末の分布の差異などに基づいた詳細な検討はあまり行なわれていない。

2. 研究の目的

今回我々は嚥下障害の原因になりうる様々な要素の中で、神経疾患、筋疾患、加齢、知覚異常の4つにしぼり系統別障害モデル動物を使用し、免疫染色による正常ラットとのTRPV1(カプサイシン受容体)、TRPV3、TRPV4(温刺激受容体)、TRPM8(冷刺激受容体)などの知覚神経終末の分布の違いやそれを考慮した各疾患別の各感覚刺激の有効性の差異などを詳細に検討し感覚刺激による嚥下障害改善法の体系的評価を行なうことにした。より詳細な各疾患別の感覚刺激の有効性が体系的に評価されれば、実際の臨床

への外挿という点からもその有効性は大きい。本研究ではまず正常ラットに、硬食、軟食、液体を与えた際の嚥下機能(嚥下回数、嚥下時間、顎舌骨筋の筋電図測定)を行ない、正常ラット(6m)の基礎データを採取する。その後、神経疾患、筋疾患、加齢、知覚異常のそれぞれについての各障害モデル動物の作成、準備を行ない正常ラットの場合と同様に硬食、軟食を与えた際の嚥下機能(嚥下回数、嚥下時間、顎舌骨筋の筋電図測定)のデータを採取する。

次の段階として正常群と各疾患群(4種)の各動物の咽頭、喉頭粘膜の試料を採取し、通法に従って凍結包埋を行ない組織切片の作成、免疫染色を行なう。免疫染色では感覚刺激に関連があると思われるTRPV1(カプサイシン受容体)、TRPV3、TRPV4(温刺激受容体)、TRPM8(冷刺激受容体)の4つの知覚神経終末について免疫染色を行なって、その分布状態を調査する。各神経終末について組織写真の撮影による組織計測を行ない、各群の分布状態の違いを統計的に調査する。その結果をふまえて4種の各疾患群と正常群に対して、冷覚、温覚、味覚、嗅覚の各感覚刺激を加えた際の嚥下機能を評価し、各感覚刺激による嚥下障害の改善効果を体系的に評価する。このような手法により今まで必ずしも十分に解明されていなかった咽頭、喉頭領域の知覚神経終末の分布の差異や障害別の各感覚刺激による嚥下障害改善効果をより詳細かつ体系的に評価することを目標とする。感覚刺激を用いた嚥下障害の改善は臨床の場においても少しずつ行なわれるようになってきているが、咽頭喉頭部領域の知覚神経終末の分布に基づいた詳細な裏づけが十分になされているかという点については不明な部分がある。嚥下障害の原因になりうる様々な要素から神経疾患、筋疾患、加齢、知覚異常の4つについて体系的にそれぞれの知覚神経終末の分布の違いを考慮して病態に応じたより有効な嚥下障害改善法が可能になれば、その結果は社会的にも実際の臨床においても嚥下障害の改善に大きく貢献すると思われる。

3. 研究の方法

正常ラットの嚥下機能の評価(嚥下回数、嚥下時間、筋電図)

正常ラットの嚥下機能についての基礎データを採取するためにWistar rat(6m)を使用し一定量の硬食、軟食、液体を与えた際の嚥下回数、嚥下時間、顎舌骨筋の筋電図測定を行ない、正常群の嚥下機能の基礎データとする。顎舌骨筋の筋電図測定は双極のステンレスワイヤー電極を留置して測定を行なう。

・各障害モデルの準備作成と、嚥下機能の評価(嚥下回数、嚥下時間、筋電図)
神経疾患、筋疾患、知覚異常、加齢の4種類

の各障害モデルの作成と準備を行なう。神経疾患モデルにはALSモデルラットを使用し、筋疾患モデルにはDMU (degenerating muscle mouse) モデルマウスを使用、知覚異常モデルにはWistar rat (6m) を使用し腹腔内麻酔と吸入麻酔を行ない、咽頭喉頭領域の知覚に関わる舌咽神経、迷走神経を切断する。加齢モデルはWistar rat を生後2年以上飼育したものを使用する。

正常ラットの場合と同様に4種類の障害モデル動物に、一定量の硬食、軟食、液体を与えた際の嚥下回数、嚥下時間、顎舌骨筋の筋電図測定を行ない、各障害モデルの嚥下機能についてのデータを採取する。

各障害モデルの咽頭喉頭領域の知覚神経終末の分布状態の評価

＜免疫染色によるTRPV1 (カプサイシン受容体)、TRPV3, TRPV4 (温刺激受容体)、TRPM8 (冷刺激受容体) の分布状態の把握＞

神経疾患、筋疾患、知覚異常、加齢の4種類の各障害群と正常ラットの各5群について、過剰麻酔によると殺後、咽頭喉頭部の試料を採取する。通法の凍結切片作成方法に従って包埋し、組織切片を作成する。その後TRPV1 (カプサイシン受容体)、TRPV3, TRPV4 (温刺激受容体)、TRPM8 (冷刺激受容体) の免疫染色を行ない、デジタル写真を撮影して組織計測を行ない咽頭喉頭領域の粘膜下における各受容体の分布状態を統計的に把握する。

咽頭喉頭領域の知覚神経終末の分布状態の結果と嚥下機能のデータを踏まえて、4種類の障害群と正常ラットの計5群に対して、各感覚刺激による嚥下反射の改善効果の有無を検討する。味覚刺激は塩味、酸味、苦味、うま味の4種類の味覚検査液を使用し、冷温刺激は温熱刺激と冷刺激について嗅覚刺激については香辛料とわさびを使用する。正常ラットの場合と同様に事前に各感覚刺激を加えてから、一定量の硬食、軟食、液体を与えた際の嚥下回数、嚥下時間、顎舌骨筋の筋電図測定を行ない、各感覚刺激を加えた場合の嚥下機能に及ぼす影響を比較検討し、その効果を体系的に評価する。

4. 研究成果

免疫染色によりPGP9.5やCGRPを含む感覚神経の分布を正常ラットやマウスの軟口蓋、咽頭及び喉頭粘膜で調べた結果、咽頭と喉頭及び口腔との境界に、PGP9.5やCGRPを含む感覚神経線維が豊富であるという結果が得られた。さらにTRPV1、TRPM8を含む神経線維も粘膜下に認められたが、TRPV3、TRPV4陽性神経線維は観察されなかった。また軟口蓋、咽頭及び喉頭における筋肉にはPGP9.5やCGRP陽性運動終板が豊富に観察された。

また、嚥下困難を有すると考えられる実験動物を用いた実験では、筋萎縮症モデルマウスにおいて、頸部の筋肉に異常が発見された。

一部の喉頭に付着する筋にエオジンの濃染が認められ、筋線維の萎縮も観察された。起始と停止部位から、この筋肉は輪状甲状筋であることが同定できた。また、舌根、咽頭、喉頭、口蓋、食道の筋では、多くのCGRP陽性運動終板が観察された。筋萎縮症モデルマウスにおいても、これらの組織にCGRP陽性運動終板が豊富に認められた。ほとんどの筋では、CGRPの分布に大きな差はなかったが、エオジン濃染が認められた輪状甲状筋の運動終板におけるCGRPの発現は非常に強く、この筋での運動終板の変性が確認された。これらの所見により、筋萎縮症における嚥下障害の原因の一つを明らかにすることができたと考えている。一方、筋萎縮症モデルマウスにおいても、舌根、咽頭、喉頭、口蓋粘上皮や上皮内のPGP9.5やCGRP、TRPV1、TRPM8、TRPV3、TRPV4の分布は正常マウスの分布と同様であった。

また、ALSモデルや加齢マウス及びラットの軟口蓋、咽頭及び喉頭粘膜におけるPGP9.5やCGRPを含む感覚及び運動終板の分布は正常ラットやマウスのそれらと大きな変化は認められなかった。TRPV1、TRPM8、TRPV3、TRPV4の分布も正常ラットやマウスと同様であった。

さらに上喉頭神経、咽頭枝などの神経損傷を行った動物では、咽頭と喉頭及び軟口蓋におけるPGP9.5、CGRP、TRPV1、TRPM8を含む感覚神経線維の多くが消失していた。PGP9.5やCGRPを含む運動終板の変化も同様であった。以前の研究及び臨床的な所見から、神経損傷により嚥下障害が発症することが知られており、嚥下機能における感覚神経や運動神経の重要性が再認識される結果となった。特にTRPV1はカプサイシンに反応するだけでなく、43°C以上の熱刺激や酸に対しても反応する。TRPM8は20°C以下の冷刺激やメンソールにより活性化される。脳梗塞などの患者は嚥下困難を有することも多いが、この嚥下障害に対しては、カプサイシントローチを服用させたり、氷を口に含ませるといった化学刺激や冷刺激を与えることにより症状の改善が見られ、臨床の場においても、これらの感覚刺激が有用であることが知られている。本研究の神経切断動物では中枢神経の障害ではなく、末梢神経の損傷であるが、TRPV1やTRPM8を含む神経線維の数が減少していることから、感覚神経損傷と嚥下障害との関連についても重要な示唆を与えるものである。

本研究の方法では、記載していないが、DMUマウスにおいては脳幹における運動神経核の変化についても明らかにした。DMUマウスの疑核、三叉神経運動核、顔面神経核における運動ニューロンの数や形態は、正常マウスのそれらと同様であった。しかしながら、運動ニューロンの編成マーカーであるCCGRPの発現がこれらの運動ニューロンで明らかに上昇していることから、運動ニューロンの細

胞体においても異常が生じていることを示唆している。さらにこれらの運動神経核においてアストロサイトのマーカーである GFAP やミクログリアのマーカーである Iba を調べたところ、GFAP の分布は正常マウスと DMU マウスとで大きな変化は認められなかった。しかしながら、Iba を含むミクログリアの数の増加や突起の長さの伸長が運動ニューロンの周囲で観察された。これらの結果も、DMU マウスにおいては末梢における筋肉の萎縮や神経の損傷だけでなく、中枢神経においても嚥下機能に関係した異常が生じていると考えられる。

これまでに、嚥下困難を有するさまざまなモデル動物の舌、咽頭、喉頭における筋肉や神経分布を明らかにできたのは、本研究テーマの大きな第一歩であると思われる。一方で、本研究の過程で観察された筋線維の萎縮や運動終板の変性の原因の同定は不十分であり、今後は、さらなる検討が必要とされる。

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 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

6. 研究組織

(1) 研究代表者 狩野 充浩 (KANO, MITSUHIRO)

東北大学・大学院歯学研究科・大学院非常勤講師

研究者番号： 10419236

(2) 連携研究者

市川 博之 (ICHIKAWA, HIROYUKI)

東北大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号： 20193435