

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：32409

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26870547

研究課題名(和文) Glycineによる睡眠時ブラキシズムの発現抑制と睡眠改善効果に関する研究

研究課題名(英文) Effects of glycine-Inhibition of sleep related bruxism and improvement of sleep

## 研究代表者

日野 峻輔 (Hino, Shunsuke)

埼玉医科大学・医学部・助教

研究者番号：50614062

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：安静睡眠時の刺激応答性変化に関わるグリシンの中枢作用部位の検討を行った。Saline投与群で、投与前と同様にQS時の開口反射誘発閾値の有意な上昇を認めた。一方、グリシン投与群では、いずれの濃度においても安静睡眠時の開口反射誘発閾値が投与後の安静覚醒時と比較して有意に低下した。また、グリシン投与は睡眠潜時を短縮する傾向を認めたが、微小覚醒の発現率や睡眠時脳波の徐波分布には影響を与えなかった。術後性障害は睡眠障害のみならず、睡眠中の顎運動活性にも一過性の可塑性変化を与えることが示された。三叉神経運動核顎二腹筋領域のグリシン受容体が睡眠時の顎運動活性の調節に積極的に関与していることも示された。

研究成果の概要(英文)：The excitability of the jaw-opening reflex (JOR) is depressed during quiet sleep (QS). Because the systemic administration of glycine reduces sleep latency and the incidence of micro-arousals and increases JOR excitability during QS in rats, it has been hypothesized that the glycine receptor system in the trigeminal motor nucleus plays a role in the maintenance of sleep quality. In the present study, we investigated the effects of the microinjection of glycine or vehicle (isotonic saline) on JOR excitability and sleep quality in rats. Compared with saline, each dose of glycine significantly reduced the JOR threshold during QS. Sleep latency and the incidence of micro-arousals were reduced, but not significantly, by 0.4 M glycine microinjection compared with saline. These findings suggest that the glycinergic system in the AD region of the trigeminal motor nucleus may be involved in the maintenance of sleep quality without affecting brain EEG excitability.

研究分野：口腔外科学

キーワード：口腔外科学 ブラキシズム グリシン

### 1. 研究開始当初の背景

睡眠時ブラキシズムは、患者の睡眠の質を低下させるのみならず、周囲で就寝を共にする家族などの眠りを妨げる原因ともなる。著しい歯牙の破折や咬耗を引き起こすことから、ブラキシズム患者には就寝時にテンプレートを装着させ咬合の破壊を防止する事が勧められている。しかしながらテンプレート療法の治療効果は患者の協力度に強く依存しており、違和感を訴える患者での治療効果は得られにくいのが現状である。加えて、テンプレート療法は対症療法であり、睡眠時ブラキシズムの発現自体を抑制することにはならず、グライディングやクレンジングによる咀嚼筋の疲労や顎関節障害を併発する症例も認められる。これらに加えて、近年では、睡眠時無呼吸症候群の患者にブラキシズムが高頻度に認められることが明らかになり (Oksenberg *et al.* *Sleep Medicine* 2002; Kato *et al.* *J Clin Sleep Med* 2013), その発現機構の解明と、より効果的な治療方法の確立が求められている。

### 2. 研究の目的

睡眠時ブラキシズムは、歯科領域において予後の不確定性に寄与するとして古くから注意されている運動異常である。睡眠科学の発達に伴い、睡眠時ブラキシズムの発現に関与する様々な因子が明らかとなりつつあるが、その発現機構は未だ不明である。研究代表者は、睡眠時ブラキシズム発現に関わる神経機構の解明を全体構想として研究を行っており、本申請では治療方法の定量評価を可能とするための睡眠時ブラキシズム動物モデルの確立を第一の目的とした。さらに、同モデルへ睡眠改善効果が報告されている薬物を投与することで、モデルの有効性ならびに睡眠時ブラキシズム発現に関与する受容体機構を検討することも目的とした。

### 3. 研究の方法

睡眠時ブラキシズムは閉口運動を主兆候とするが、実験的に睡眠中の動物に閉口運動を誘発することは困難である (Adachi *et al.* *J Neurophysiol* 2008)。そこで、開口筋ならびに閉口筋の運動神経は末梢からの入力を同時に受けている (Lund *et al.* *Orofacial Pain* 2008) ことから、容易に誘発可能な開口運動を指標として、睡眠による脳幹部活動性変化に関与する受容体機構を *in vivo* ならびに *in vitro* で解明することが本研究の最大の特色である。本研究により睡眠改善効果が報告されている glycine の作用部位ならびに脳幹部活動性への影響が明らかになることで、本モデルの有効性自体も示すことが可能となり、今後の睡眠時ブラキシズム発症機構解明ならびに治療方法の確立に寄与するところが大きいと考えられた。

**In vivo 動物モデル**: Sprague-Dawley 雄性ラット (5.5 週齢) に、イソフルラン全身麻酔下で心電図 (EKG), 筋電図 (EMG: 顎二腹筋前腹と咬筋), 脳波 (EEG: Cz-P3/P4 相当), 眼電図 (EOG) 採取用電極, ならびに刺激用電極 (オトガイ舌筋) を埋入した。脳内への薬物投与群に対しては両側三叉神経運動核顎二腹筋領域に金属ガイドカニューレを植立した。術後にモルヒネ (10 mg/kg, i.p.) を投与し, 回復までの期間, 12 時間明暗サイクル (8:00 点灯) にて摂食・摂水非制限で飼育し観察環境馴化も行った。術後 7 日 (D7), 13 日 (D13) に観察用ケージに入れ, データ計測用ケーブルをコネクタブロックに取り付け, 観察・記録を行った。生理学的指標 (EMG, EOG, EEG, EKG) は, 5 秒 epoch で解析しスコア化した。安静覚醒時にオトガイ舌筋に電気刺激 (200  $\mu$ s pulse, 0.2 Hz, 5 回) を加え, 3 回以上顎二腹筋活動を発現させる刺激強度を開口反射誘発閾値 (TH) とし, TH ならびに誘発された顎二腹筋活動の詳細 (latency, duration, AUC) を 5 分間隔で 3 回 (QWB 1-3) 計測した。その後, 自発睡眠下 (安静睡眠時: QS 1-3) と, その後の覚醒時 (QWA 1-3) の TH を同様に求めた。薬物投与群には, 更にグリシン (0.1 - 0.4 M, 0.2  $\mu$ l/ side) を投与し同様の検討を行い, 対照として saline 投与を行った群との比較を行った。なお, QWB1 から QS1 までの間を睡眠潜時とし, 安静睡眠時には微小覚醒の発現回数の測定も行い, 各測定時には, 刺激強度と開口反射応答性の相関を検討するために TH の 1.5-2 倍の刺激も与えた。実験終了後, ラットを深麻酔下 (pentobarbital 80 mg/kg, ip) で 4% paraformaldehyde にて灌流固定し, 脳幹部のスライス標本作製し neutral red 染色後に薬物注入部位の同定を行った。

### 4. 研究成果

【術後性疼痛の睡眠時顎運動活性への影響】 D7 では, QWB に比較して TH が QS 時に下降する群と上昇する群に分けられた。しかしながら下降群は, D13 では QWB と比較して QS で TH の有意な上昇を認めた (Fig. 1A & B)。上昇群では, D13 でも D7 同様に TH の上昇を認めた (Fig. 1C & D)。睡眠-覚醒サイクルにおける EEG を各周波数帯の分布状況で解析すると, 覚醒時ならびに睡眠時にかかわらず, 上昇群, 下降群のいずれの群でも,  $\delta$  波の占める割合が一様に高いことが明らかになった。その中でも睡眠時には,  $\delta$  波がいずれの群においても有意に上昇し, それに伴いその他の周波数帯の分布が減少する傾向を示すことが明らかになった (Fig. 2)。下降群, 上昇群共に D13 において睡眠潜時の

短縮と微小覚醒発現の上昇を認めた (Fig. 3) .

Figure. 1

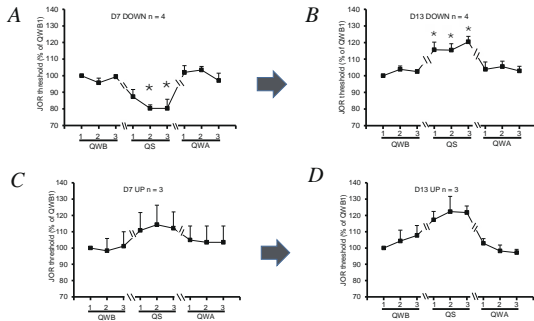


Figure. 2

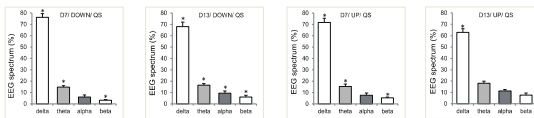
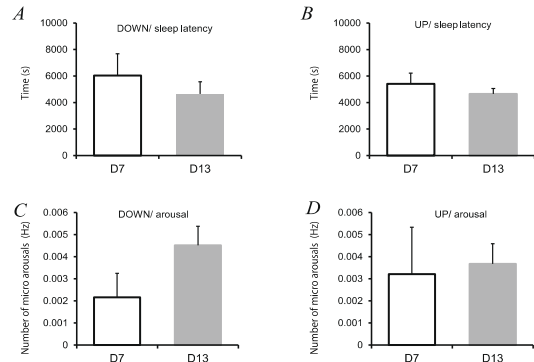


Figure. 3



【睡眠時顎運動活性調節に働く中枢グリシン作用部位】

三叉神経運動核顎二腹筋領域へのグリシンの微量投与は、QS 時の TH の下降を引き起こした (Fig.4) . しかし、睡眠潜時や微小覚醒、脳波の分布に影響を認めず、筋活動性にも影響を与えなかった (Fig.5) .

Figure. 4

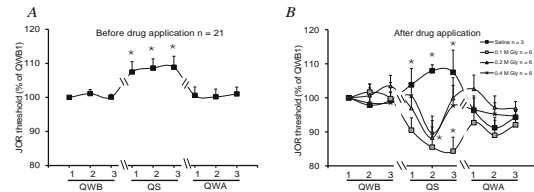
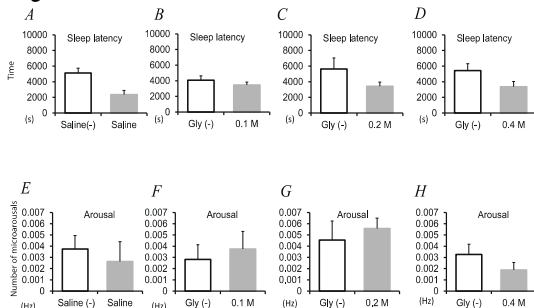


Figure. 5



術後性障害は睡眠障害のみならず、睡眠中の顎運動活性にも一過性の可塑性変化を与えることが示された。また、グリシンの脳内投与は同薬を全身投与した際と比較して、開口反射活性をより強く上昇させたことから、三叉神経運動核顎二腹筋領域のグリシン受容体が睡眠時の顎運動活性の調節に積極的に関与していることも示された。しかしながら、グリシンの脳内投与は睡眠潜時や脳波分布には大きな変化を及ぼさなかった。このことは、睡眠の質に関する神経回路を構成する三叉神経運動核を含む神経核が相互補完的に機能することで、恒常性が保たれている可能性が示唆された。

また、当初の目的で示された睡眠時プラキズム動物モデルの確立も行われ、今後もより発展した研究成果が期待される。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び研究協力者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. Shunsuke Hino, Akira Nishiyama, Tomohiko Matsuta, Norio Horie, Tetsuo Shimoyama, Shoji Tanaka, Hiroshi Sakagami. Quest for cells Responsible for Age-related Increase of Salivary Glycine and Proline. In Vivo Volume30 pp.91-98.2016. (査読有)

〔学会発表〕(計 8 件)

1. R.ODAI, K.ADACHI, S.HINO, T.SHIMOYAMA, H.SAKAGAMI, G.J.LAVIGNE, B.J.SESSLE Effects of glycine injection into trigeminal motor nucleus on jaw-opening reflex excitability during sleep in rats. Society for Neuroscience 2016. 2016 年 11 月 12 日-16 日 San Diego, USA.
2. 井出令奈,安達一典,渡部茂,坂上宏 ラットの睡眠時開口反射活性の術後性変化. 第 58 回歯科基礎医学会学術大会. 2016 年 8 月 24 日-26 日. 北海道.
3. 井出令奈,安達一典,渡部茂,坂上宏 安静時睡眠ラットにおけるグリシン受容体機構の検討. 第 134 回日本薬理学会関東支部. 2016 年 7 月 9 日. 栃木.
4. 尾台令奈,安達一典,渡部茂,坂上宏 ラットの術後性回復と安静睡眠時の末梢刺激応答性変化. 第 57 回歯科基礎医学会学術大会. 2015 年 9 月 11 日-13 日. 新潟.
5. R.ODAI, K.ADACHI, S.HINO, T.SHIMOYAMA, H.SAKAGAMI, S.WATANABE, G.J.LAVIGNE, B.J.SESSLE Time-related changes of jaw-opening reflex excitability in quiet sleep in rats during post-surgical recovery. Society for Neuroscience 2015. 2015 年 10 月 17

- 日-21日 Chicago, USA.
6. 日野峻輔, 尾台令奈, 堀江憲夫, 下山哲夫, 坂上宏, 安達一典 睡眠時の顎運動活性に関わる神経機構の検討. 第132回日本薬理学会関東部会. 2015年7月4日. 千葉.
  7. K.ADACHI, S.HINO, R.ODAI, T.SHIMOYMA, H.SAKAGAMI, G.J.LAVIGNE, B.J.SESSLE Glycine-mediated jaw-opening reflex excitability in rats. Society for Neuroscience 2014. 2014年11月15日-19日 Washington DC, USA.
  8. 尾台令奈, 日野峻輔, 渡部茂, 坂上宏, 安達一典 グリシンの三叉神経運動核への投与がラットの開口反射興奮性に及ぼす影響. 第56回日本歯科基礎医学会学術大会. 2014年9月26日 福岡

〔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

日野 峻輔 (HINO, Shunsuke)  
埼玉医科大学・医学部・助教  
研究者番号: 50614062

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

##### (3) 連携研究者

#### (4) 研究協力者

安達 一典 (ADACHI, Kazunori)  
明海大学・歯学部・准教授  
研究者番号: 20349963