

Title	摂食・嚥下機能解明へのアプローチ
Author(s)	阿部, 伸一
Journal	歯科学報, 102(12): 927-932
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10130/642">http://hdl.handle.net/10130/642</a>
Right	

## 摂食・嚥下機能解明へのアプローチ

阿 部 伸 一

東京歯科大学・口腔科学研究センター，解剖学講座

### はじめに

高齢社会である現在，高齢者の嚥下障害による誤嚥性肺炎などが社会問題となっている。そこで，摂食・嚥下領域に関して医療現場は勿論のこと，多方面からの研究がなされ，摂食・嚥下の複雑なメカニズムが解明されつつある。しかし，その多くは神経生理学的な研究が中心であり，摂食・嚥下関連の筋組織の持つ制御機構についてはほとんど報告がなく不明な点が多い。摂食・嚥下の一連の動作には直接的に30以上の筋が関与しており，それらが実にタイミングよく連動する(図1, 2)。しかし口腔領域の筋群には，離乳，歯牙喪失による咬合関係の変化など四肢筋などではみられない環境変化にさらされている。この環境変化に対し，それぞれの筋が何らかの細胞生物学的特性を適応変化させ，嚥下運動全体の機能を維持していると考えられる。すなわち，蛋白・分子レベルでそれぞれの筋の筋線維特性を明らかにすることが，摂食・嚥下の複雑なメカニズムの解明に一助をなし，機能障害に陥った筋を特定する際の基礎的データにもつながる。さらには，これら筋群のほとんどが口腔内，外より明視的に位置を同定することができ，医療現場に対しての情報提供にもつながるのではないかと考える。

中枢神経系の疾患を原因とする摂食・嚥下障害は脳を含む全身医療と密接に関連する新たな治療分野として注目を集めている。摂食・嚥下過程は6期に分けて論じられる場合がある(図3)<sup>1)</sup>，

咀嚼運動を主体とする stage 3(咀嚼と食塊形成)以外はその中枢性制御機構はほとんど解明されていない。

そこで著者は下記2点について焦点を絞り研究を展開しているので，本稿ではその一端について解説する。

摂食・嚥下関連筋群の細胞生物学的特性の解明  
脳磁図計による中枢性嚥下誘発部位の検索

摂食・嚥下関連筋群の細胞生物学的特性の解明  
ミオシン重鎖(MHC)は，筋構成蛋白のうち，最も重要な構成要素である<sup>2,3)</sup>。近年MHCのIsoformは9種類(MHCemb, MHCneo, MHC-1/β, MHC-2a, MHC-2b, MHC-2d, MHCeo, MHCm and MHC-α)次々に報告されている<sup>3,4)</sup>。MHC-βはMHC-1またはMHC-slowと呼ばれ，心筋及び遅筋に発現する<sup>5)</sup>。速筋にはMHC-2a, MHC-2bとMHC-2dの3種が報告されている<sup>3,5)</sup>(図4)。このMHCの各Isoformの発見によって，これまで同定できなかった筋の機能変化に適応する筋線維特性の詳細な変化が捉えられるようになったのである<sup>3,4)</sup>。しかしこれまでの報告は四肢筋の成長過程などを観察しているものが多かったが，著者は口腔・咽頭領域の筋を研究対象として報告を行ってきた。口腔・咽頭領域の筋は四肢筋にはない離乳，歯牙喪失による咬合関係の変化など口腔領域特有の機能変化にMHCの各Isoformの組成を変化させ，自らの

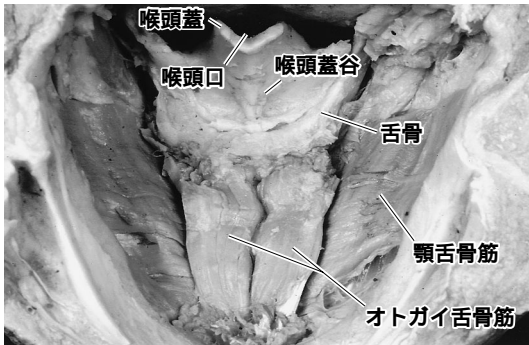


図1 頭頸部水平断面を上方より観察

1. 食物の認識
  2. 口への取り込み
  3. 咀嚼と食塊形成
  4. 奥舌、咽頭への送り込み
  5. 咽頭通過、食道への送り込み
  6. 食道通過
- 摂食
- 嚥下

図3 6期に、分類した場合の摂食のステージ<sup>1)</sup>

機能も変化させていることが動物実験で明らかとなってきた<sup>6,7)</sup>。動物実験は『東京歯科大学動物実験指針』に基づいて倫理的に行っている。

#### 1) 離乳期のマウス咬筋の筋線維特性の変化

これまでマウス成獣の咬筋は、速筋タイプのみから構成されることは知られていた。しかし、速筋タイプの各 Isoform の構成比が発育過程でどのように変化していくのか不明であった。特に発育過程に見られる「離乳」という現象は、咬筋に大きな機能的役割の変化をもたらすと想像できる。そこで出生直後、生後3, 7, 14, 21日齢の咬筋の Isoform の構成比を蛋白レベルで明らかにした。その結果、出生直後から14日齢までは MHC - 2a と MHC - 2d の発現がみられ、MHC - 2b は発現していなかった。そして生後21日目になると速筋タイプの Isoform である MHC - 1 および MHC - 2a が消失し、MHC - 2b の発現が見られた(図5)。この MHC - 2b は、速筋タイプの Isoform の中で最も収縮速度が速く、力の強い Iso-

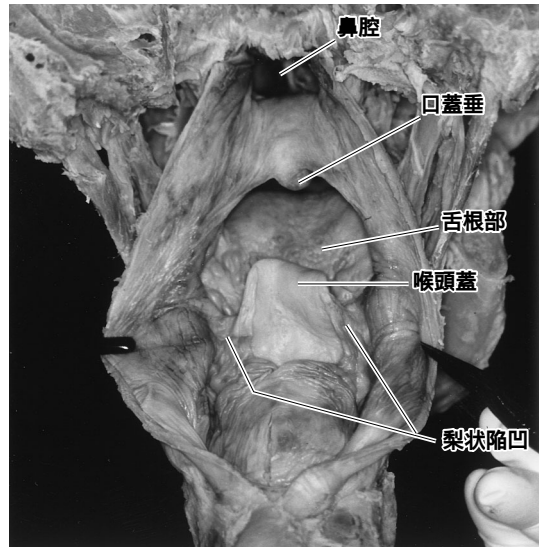


図2 咽頭を後方から観察

(図1, 図2の解説)

食塊が咽頭を通過する際には、前方に位置する喉頭蓋が後上方へ移動することにより、喉頭の入口である喉頭口を塞ぎ、食塊は喉頭蓋谷、左右の梨状陥凹を経て食道へと誘導される。この一連の動作に多くの筋が関与している。

form である。マウスの離乳期は生後2から3週とされており、MHC - 2b の発現は離乳時期と一致していた。対照である前頭骨筋にはこのような変化は認められなかった。この結果より、吸啜から咀嚼への機能の変化と MHC Isoform の構成比の変化に関係があることが示唆された<sup>7)</sup>。

この実験の結果から口腔領域の離乳という機能的な変化が、筋線維特性に何らかの影響を与える可能性が考えられた。

#### 2) 無歯症マウス咬筋の細胞生物学的特性の解析混乱

歯牙の喪失は、咀嚼機能に変化を与える大きな要因である。すなわちこの咀嚼機能を担う咬筋は常に様々な環境変化にさらされながら「適応変化」し、機能の恒常性を保っている可能性がある。これまで周囲の環境変化に対する骨のリモデリングなどは知られていたが、筋肉内部での変化はそれほど議論の対象になっていなかった。

そこで無歯状態が咬筋の筋線維特性に与える影

### Myosin heavy chain (MHC)

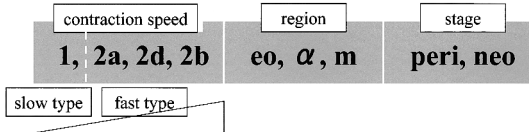


図4 ミオシン重鎖 Isoform

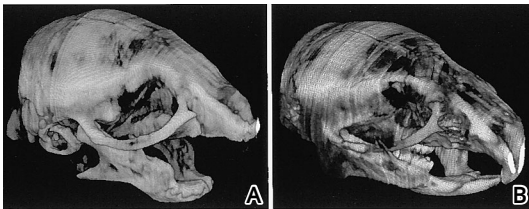


図6 マイクロCTにて撮影後、マウス頭蓋を再構築した像<sup>3)</sup>

- A : 大理石骨病モデルマウス(歯は形成されるが萌出してこない)
- B : ノーマルマウス

響について検索を試みた。注目したのは、大理石骨病のモデルマウスである。このマウスは、破骨細胞の形成因子の異常により、骨芽細胞と破骨細胞のバランスが崩れ大理石骨病を発症する<sup>3)</sup>。口腔領域の異常として歯は正常に形成されるが、萌出の段階で、骨の改造機転が異常をきたすため、そのまま顎骨の中に残留してしまう(図6)。このマウスの筋組織に異常がみられるとの報告はなく、無歯状態が筋組織形成に与える影響に関しての実験系として適していると判断した。

実験に供したのは、大理石骨病モデルマウスのうち *microphthalmia* (*mi/mi*) マウスであり、骨の吸収不全による歯の萌出障害が認められる。この *mi/mi* マウスを用いて、無歯状態という機能的な違いが咬筋筋線維特性に与える影響について筋線維の形態的観察、免疫組織化学的観察を行った。その結果、形態的観察では生後2, 4週齢の *mi/mi* マウスとコントロールに大きな差は認められなかった。しかしながら20週齢では形態的な差が認められ、*mi/mi* マウスに正常よりも小さな筋線維が多数観察された。免疫組織化学的観察

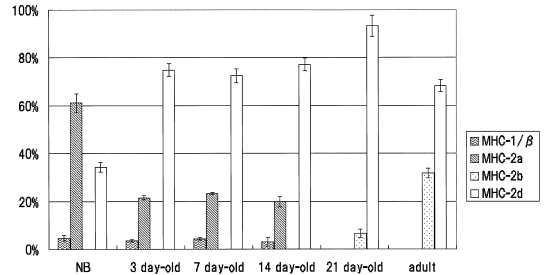


図5 出生時、3日、7日、14日、21日齢、そして成獣マウス咬筋のMHC各Isoformの変化<sup>7)</sup>

14日齢まで認められたMHC-1, 2aが21日齢以降消失し、成獣型のMHC-2bが出現していた。この時期に離乳があり、機能変化が影響した結果であると思われる。

では4週齢において、コントロールでは発生初期にしか見られないMHC-slowタイプを認めた。さらに20週齢においてコントロール群と違う筋線維構成を呈していた。

この実験の結果からも1)で記載の内容と同様に咬合状態の変化などの機能的な変化が、筋線維特性に何らかの影響を与える可能性を示唆するものであった(in preparation)。

### 3) ヒト摂食・嚥下関連筋群の細胞生物学的特性の解明へ向けて

上記で紹介した研究を含め、これまで動物実験において、筋の機能的な変化がミオシン重鎖Isoformの構成比に影響を与えることをこれまで報告してきた。これらのevidenceを背景に、ヒトの摂食・嚥下関連筋群にも同様の変化が起こっているのではないかと考えることができる。ヒトのミオシン重鎖Isoformを解析するためには、マウスの研究条件、プライマーなどを使用することはできないため、新たに方法論の確立が必要である。現在、至適条件の設定などを日々検討しているところであるが、その方法論の一端を紹介する。実験は『ヘルシンキ宣言』を遵守して倫理的に行っている。

《ヒト摂食・嚥下関連筋群におけるミオシン重鎖Isoform mRNAの定量を試みるためのLightcycler反応条件の至適化》

Lightcycler を使用して mRNA を定量するためには、その反応条件を模索しなくてはならない。現段階で最適と考えている条件にて予備実験を試みた。

Lightcycler 用のホットスタート PCR 用反応液は、調整済みの LC FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche) を用いた。まず、PCR 産物を原液とし希釈系列を作製し、そのうち 106, 107, 108, 109 倍希釈したものをスタンダードとして使用した。PCR 産物の希釈系列によるスタンダード用 PCR mixture は、滅菌水 10  $\mu$ l と MgCl<sub>2</sub> (25mM) 1  $\mu$ l、そして SYBR Green I (1/60,000 dilution) と  $\lambda$ DNA (5 pg/ $\mu$ l) を含んだ LC FastStart DNA Master SYBR Green I を 2  $\mu$ l 加え、さらに Oligo 5 primer design (Biogene, Ltd) を用いて作成した Forward Primer (10 pmol/ $\mu$ l) および Reverse Primer (10 pmol/ $\mu$ l) をそれぞれ 0.5  $\mu$ l 加え、最終反応容量が 20  $\mu$ l となるよう先ほど作成した希釈 PCR 産物を 5  $\mu$ l 加えた。用いた primer は MHC - 2b (2d, 2a, 1, SM) の計 5 種類で、それぞれの DNA のフルシーケンスより特異的な部位を抽出し設計した。それぞれの塩基配列は MHC - 2b (Forward : 5' - tcagctaaagaggaacctctc - 3', Reverse : 5' - ctctgatggcatcatccaaa - 3'; Accession : AF111783), MHC - 2d (Forward : 5' - gaagaagcggaggaacaat - 3', Reverse : 5' - ggtcacccttcagcagttta - 3'; Accession : AF111785), MHC - 2a (Forward : 5' - caatccaacaccaatctagc - 3', Reverse : 5' - gcaacagggtagaatacaca - 3'; Accession : AF111784), MHC - 1 (Forward : 5' - tgcaggacctgtagaca - 3', Reverse : 5' - gggctgagcagatcaaga - 3'; Accession : NM\_000257), MHC - SM (Forward : 5' - tagaaggctctgaggacgta - 3', Reverse : 5' - gcttgttctgggtgttg - 3'; Accession : NM\_002474) とした。PCR mixture は、滅菌水 14  $\mu$ l と MgCl<sub>2</sub> (25mM) 1  $\mu$ l、そして SYBR Green I (1/60,000 dilution) と  $\lambda$ DNA (5 pg/ $\mu$ l) を含んだ LC FastStart DNA Master SYBR Green I を 2  $\mu$ l 加え、さらに Forward Primer (10 pmol/ $\mu$ l) および Reverse Primer (10 pmol/

$\mu$ l) をそれぞれ 0.5  $\mu$ l を加え、最終反応容量が 20  $\mu$ l となる target DNA を 1  $\mu$ l 加え作成した。作成したそれぞれの PCR mixture (20  $\mu$ l) を、それぞれキャピラリーのガラス部分に加え、50 サイクル反応させた。遺伝子増幅プログラムは、70 を 15 秒という melting program に従い、70 から 95 への変遷期は 1 秒 0.1 の割合で蛍光度を連続的にモニタリングした。蛍光チャンネルは F 1 を用い、ゲインはそれぞれ MHC - 2b では 94.82, MHC - 2d は 87.49, MHC - 2a は 87.75, MHC - 1 は 91.01, MHC - SM は 84.79 を指していた (図 7 - 10)。

#### 《予備実験の結果》

いくつかの興味ある知見が集まりつつあるが、一例を挙げると上・中・下の 3 部位から構成される咽頭収縮筋はその特性が部位によって大きく異なっていることが明らかとなってきた。すなわち、頬筋に続く筋束には骨格筋タイプの Isoform が頬筋の構成比に類似して存在し、その上下の筋束には骨格筋タイプの Isoform があまり存在せず、平滑筋特有の Isoform が検出されてきている。現在例数を積み、average をかけているが、この傾向から、頬筋に続く部分の筋束が嚥下の際に食塊を最後に飲みきるための大きな力を発揮している可能性が示唆されるのである。中枢性に異常がないにもかかわらず、最後に嚥下物を飲みきることができないため、食塊が喉頭蓋蓋などに残留してしまう患者はこの部分の筋束の Isoform 構成比に異常が起こり、食塊を絞り込む作用をする頬筋類似の筋特性から、上下の筋束のような平滑筋類似の筋特性に変化してしまっている可能性も考えられる。

#### 脳磁図計による中枢性嚥下誘発部位の検索

これまで嚥下というとその嚥下中枢は延髄に存在し、口腔、咽頭領域からの刺激を受け、反射的に嚥下関連筋を動かす<sup>9)</sup>と考えられてきた。しかしながら、自らの意志によって何かを飲もうとする随意的な嚥下に関する解明はほとんどなされていなかった。何かを飲む、飲まないは、嚥下の直

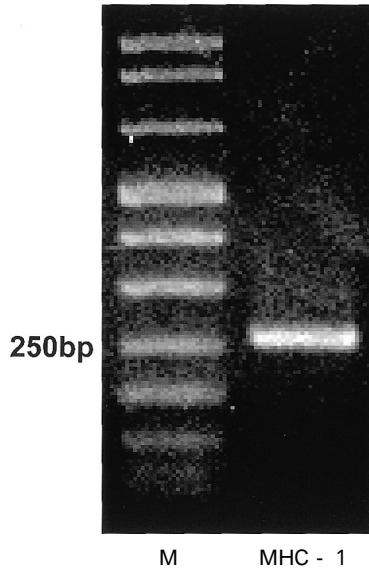


図7 PCR産物の電気泳動(3%TBEアガロースゲル)

M:分子量マーカー(ロシュダイアグノスティックス)

MHC-1:PCR産物(246bp・ヒトMHC-1)

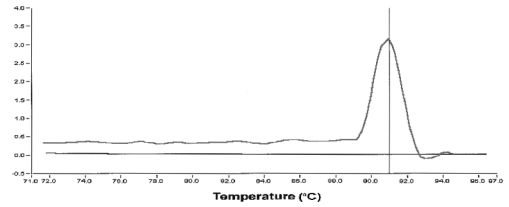


図8 適正なプライマーであることの判定(ヒトMHC-1)

Tm値と増幅の一致を確認する

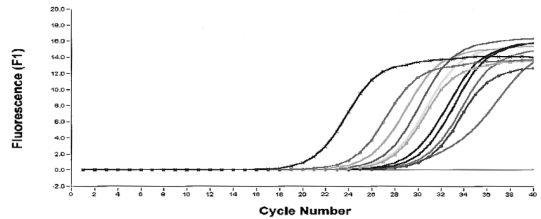


図9 増幅曲線(ヒトMHC-1)

それぞれの試料が増幅するサイクル数の決定

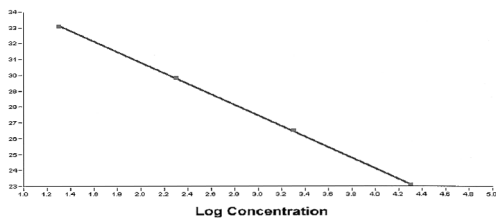
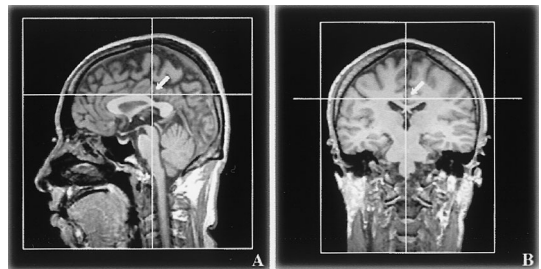


図10 あらかじめ濃度がわかっているPCR産物により作成した検量線であり、ここから濃度を決定する



A:矢状断

B:前額断

図11 Overlapping of the nerve activity sources on MRI images.

嚥下前1405msの帯状回(矢印)に神経活動が推定された<sup>10)</sup>。(被検者2, GOF = 80%以上)

前に自ら決めることができ、食事中何気なく嚥下している中にも自らの意志はあると考えた。我々は、被験者が、自らの意志で嚥下をするその前段階における大脳皮質の電気的活動を高時間・空間分解能で捉えることができた<sup>10)</sup>。用いたのは306チャンネル前頭型脳磁図計である。被験者によって若干の時間的なずれはあるものの、嚥下をする2000ms前から1000ms前までの間で一定時間、帯状回および補足運動野で磁場の発生源、すなわち電氣的神経活動の発生源の行き来が推定された(図11)。大脳辺縁系である帯状回では、海馬から

の記憶の呼び出しと反応の選別がなされ、補足運動野では、これから行おうとする運動の中枢プログラムが発火され、その両者は綿密に、しかも両側性に情報交換を行っていることを意味していると考えられ、複雑な嚥下運動にこれら、中枢性の制御機構も重要な役割をしている可能性が明らかとなった。我々はこの脳磁図計の特性を利用し、随意嚥下の出発点を解明し、嚥下が起こるときまでの「脳内プロセス」を明らかにする可能性がみ

えてきたと考えている( submitting )。

### おわりに

以上が平成13年度・学長奨励研究に採択していただいた期間内に明らかとなってきた研究成果である。多くの MHC Isoform が発見されたことにより、今まで解明されていなかった筋内部のより詳細な筋線維特性の変化を同定できるようになった。この結果から考えられることの一例を挙げると、日常の臨床の中で補綴処置により理想的な咬合関係が回復できたとしても、これまであまり議論されていなかった口腔・咽頭領域の筋群内部が突然の環境変化に対応できず、ミオシン重鎖各 Isoform の構成比を再構築している可能性を示唆しており、「義歯調整」という概念に「口腔領域の組織に対するリハビリテーション」という概念も加えることが必要になってくるであろう。また様々な形で嚥下障害は、原因となった筋(舌を含む)のミオシン重鎖各 Isoform 構成比の崩壊を引き起こすと仮定すると、そのシグナルを我々歯科医が biopsy などですぐ診断することができる可能性も考えられる。このように口腔・咽頭領域の筋組織を中心とした細胞生物学的研究が摂食・嚥下機能解明へ向けた一助となる。さらに脳磁図計の研究成果がプラスされていくことによって、歯科医という立場、視点でしかかかわることのできない研究・診療体系が構築され、その過程で積み重ねていく evidence が、歯科医学を社会に還元していくことになるものと考えられる。

本論文の要旨の一部は、第273回東京歯科大学学会(例会)において、学長奨励研究報告として発表した。

### 謝辞

稿を終えるにあたり、常に研究のご指導、ご協力をいただいております病理学講座、微生物学講座、生化学講座、臨床検査学講座、超微構造学講座、理工学講座、衛生学講座、生理学講座、オーラルメディシン講座、整形外科、精神・神経科、脳科学研究施設の先生方、また、井出吉信教授はじめ解剖学講座の教室員各位、さらに海外を含め他大学、他研究施設の先生方に感謝いたします。

これまでの一連の研究には、研究代表者として文部省科学研究費補助金(平成9 - 10年度・奨励研究 A 09771518, 平成10 - 13年度・基盤 B (2)10557161, 平成12 - 13年度・奨励研究 A 12771094, 平成14 - 16年度・若手研究 A 14704046), 東京歯科大学・口腔科学研究センター(平成8 - 10年度・HRC961D01, 平成12 - 15年度・HRC3A01)および平成13年度学長奨励研究として研究費の助成を受けました。

### 参考文献

- 1) 藤島一郎：新版口から食べる 嚥下障害 Q & A . 中央法規出版, 東京, 1998 .
- 2) Usami, A., Abe, S., Ide, Y. : Myosin heavy chain isoforms of the murine masseter muscle during pre and postnatal development. *Anat Histol Embryol* 32, 2003 . (in press)
- 3) Schiaffino, S., Reggiani, C. : Molecular diversity of myofibrillar proteins : Gene regulation and functional significance. *Physiol Rev*, 76 : 371 ~ 425, 1996 .
- 4) Brueckner, J. K., Itkis, O., Porter, P. D. : Spatial and temporal patterns of myosin heavy chain expression in developing rat extraocular muscle. *J Muscle Res Cell Motil*, 17 : 297 ~ 312, 1996 .
- 5) Hori, A., Ishihara, A., Kobayashi, S., Ibata, Y. : Immunohistochemical classification of skeletal muscle fibers. *Acta Histochem Cytochem*, 31 : 375 ~ 384, 1998 .
- 6) Abe, S., Maejima, M., Watanabe, H., Shibahara, T., Agematsu, H., Doi, T., Sakiyama, K., Usami, A., Gojyo, K., Hashimoto, M., Yoshinari, M., Ide, Y. : Muscle - fiber characteristics in the adult mouse tongue muscles. *Anat Sci Int*, 77 : 145 ~ 148, 2002 .
- 7) Gojo, S., Abe, S., Ide, Y. : Characteristics of myofibers in the masseter muscle of mice during postnatal growth. *Anat Histol Embryol*, 31 : 1 ~ 9, 2002 .
- 8) Abe, S., Watanabe, H., Hirayama, A., Shibuya, E., Hashimoto, M. and Ide, Y. : Morphological study of the femur in osteopetrotic (op / op) mice using micro-computed tomography. *Brit J Radiol*, 73 : 1078 ~ 1082, 2000 .
- 9) Abe, S., Kaneko, H., Nakamura, Y., Watanabe, Y., Shintani, M., Hashimoto, M., Yamane, G., Ide, Y., Shimonono, M., Ishikawa, T., Yamada, Y. and Hayashi, T. : Experimental device to detect laryngeal movement accompanying swallowing. *Bull. Tokyo dent Coll*, 43 (3) : 199 ~ 203, 2002 .
- 10) Abe, S., Watanabe, Y., Shintani, M., Tazaki, M., Takahashi, M., Yamane, G., Ide, Y., Yamada, Y., Shimonono, M., Ishikawa, T. : Magnetoencephalographic study of the starting point of voluntary swallowing. *Cranio*, 21(1), 2003 (in press)