

咀嚼が睡眠・覚醒リズムおよび生体に及ぼす影響についての研究

姉川 絵美子

スタンフォード大学医学部 Research Assistant

(現 久留米大学医学部 助教)

緒言

咀嚼回数の減少と、睡眠時間の短縮/不規則化には、共通のメカニズム、もしくは直接的な因果関係があるかもしれない。近年、加工食品の氾濫により、食品の軟食化の傾向が進んでいる。その結果として小児の発育過程における咀嚼回数の減少が顕著となり、肥満、脳内循環血流量の低下、記憶・学習能力の低下、顎骨形態の異常など、様々な影響を及ぼすことが報告されている。また高齢化にともなった老年期における非経口栄養管理も咀嚼回数の減少を招き、認知症や脳機能の憎悪を昂進する要因ともなる。Mitome¹⁾らは、発育過程において粉末飼料を与え続けると、海馬領域の神経新生が減少する事を明らかにし、咀嚼が脳の機能維持に重要な因子の一つであると述べた。また Onozuka²⁾らは、咀嚼刺激が脳の広範な領域の神経活動を上昇させると、脳血流量が増加し、学習・記憶能力の低下、海馬の神経活動の減少が見られると示唆している。また、Sakata³⁾は咀嚼刺激が、脳内ヒスタミンの放出を制御することを明らかにした。このヒスタミン神経系は汎投射で、海馬以外にも、大脳皮質、視床に密に投射し、摂食抑制やエネルギー代謝促進(内臓脂肪燃焼促進)に影響を及ぼす。また、後部視床下部の脳内ヒスタミンは、覚醒アミンとして概日リズムにも影響を及ぼすことが知られている。これらのことより、咀嚼刺激が、覚醒を誘発し睡眠を阻害するヒスタミンの放出を制御していることが想像されるが、咀嚼刺激と概日リズムについて直接的な因果関係を報告した例は未だない。今回我々は“食物の形状が睡眠にも影響を及ぼす”という仮説を立て、これを明らかにする為の実験系を作成した。

実験方法

1. 動物実験

Wister系雄性マウスを生後25日齢より離乳し、粉末

飼料のみで飼育した群 (powder diet: PD) と通常固形飼料で飼育した群 (solid diet: SD) をそれぞれ10匹ずつ、合計20匹生育させた。粉末飼料は通常固形飼料を粉末状にすりつぶしたものを扱い、それぞれ個別のケージにて自由摂餌・自由摂水で飼育した (12:12 light-dark cycle (lights on at 07:00 h; zeitgeber time [ZT] 0, with room temperature at 23 ± 2°C)。当該実験において、行動量の固体差はデータのバイアスとなるため、実験に移る前にマウスの行動量を測定し、差が少ないマウスを両群より選出した。方法は、環境への適応期間として、記録する1週間前より home cage に移動させて飼育し、MicroVAX single axis home cage monitoring system を用いて24時間行動量を記録した。得られたデータは MicroMax130 ソフトウェアにて解析し、ほぼ結果の似通ったマウスのみ実験用マウスとして8匹ずつ、合計16匹抽出した。

2. 睡眠データおよび、行動量・体温を集積する為のインプラント手術

25日齢時に16匹全てに対して手術を行った。手術は十分な麻酔管理のもと頭蓋骨にドリリングし、前頭皮質より脳電図 (EEG)、頸部僧帽筋より筋電位 (EMG) を記録するため、ステンレスワイヤーのケーブル電極を埋入し、歯科用レジンにて固定する。さらに体温 (テレメトリーシステムによる腹腔内体温)、行動 (情動行動、自発行動量) を記録するため、テレメトリーを腹膜上に埋入し絹糸にて固定する。

3. 実験1: 両群の体重変化

マウスの体重は、電子スケールを用いて65、90、116、196、250日齢時に測定を行った。両群の比較には Two-way repeated measures ANOVA を用いた。

4. 実験 2: 睡眠ポリグラフ (EEG/EMG、体温、行動量) を 24 時間記録し、睡眠の様相を体系的に解析する -Baseline

データの集積は、手術 2 週間後に開始する。当施設が有する大規模なげっ歯類用の睡眠ポリグラフを用い、睡眠脳波 (EEG)、筋電位 (EMG) および、体温、行動量を記録する。これらのデータ解析には、睡眠解析ソフト Sleep Sign ver.2.0 (キッセイコムテック) を用いる。睡眠パターン解析および評価法は、Fujiki⁴⁾ らの方法に準じて行い、睡眠-覚醒サイクルを 3 段階にわけ (non-REM, REM, Wake)、各ステージの相対量の割合や持続時間を算出し、両群を比較する。

5. 実験 3: 絶食を行い、食事再開後での急激な咀嚼刺激の再開の影響を観察する -Fasting sessions

絶食により脳内ヒスタミン遊離が増大することより、睡眠-覚醒サイクルおよび体温調節の変化を分析し、それぞれの群におけるヒスタミンの変化や、絶食のリバウンドが概日リズム調節と、ホメオスタシス機構にどう影響を与えるか観察する。方法は 2 日間の絶食を行い、絶食時の覚醒・行動量を比較した。絶食 (飲水可) は 2 日間とし、絶食 2 日目から 24 時間、および食事再開後 24 時間の睡眠ポリグラフのデータ集積をおこない、実験 2 と同様にデータの集積および評価を行った。

6. 実験 4: 海馬歯状回領域 (SGZ) での神経細胞新生の観察

神経幹細胞は SGZ の再内層で顕著に細胞分裂しており、その場でニューロンへと分化することより、免疫染色した脳切片の SGZ における新生細胞数を比較をした。睡眠記録後、8 月齢で脳内新生神経細胞のマーカーである BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine) をマウスに 6 日間腹腔内投与し (50mg/kg/day)、投与翌日に灌流固定後、脳切片 (組織を固定後、凍結させ、クライオスタットで 40 μm の厚さに冠状切断) を免疫組織染色した。染色は Fukuhara らのプロトコールに準じて用い、スライドガラスに封入した。各々のマウスの Bregma からの距離がほぼ等しい脳切片を用いて、SGZ を 3 つの領域 (Molecular DG: MoDG, Granular DG: GrDG, Polymorph DG: PoDG) に分け、電子顕微鏡を用いて新生神経数の定量比較を行った。定量は同一の研究者がブラインド方式で行った。統計学的検討として、Repeated measures ANOVA を用いた。

7. 実験 5: 頭蓋顔面形態の評価

実験 4 の後、H₂CO₃ 内でマウスの頭部を煮沸する事により、頭蓋骨周囲の軟組織を完全に除去し、自然乾燥のち顎骨の形態評価を行った。計測項目は、①: 頬骨幅径 (頬骨弓の左右間最大幅径)、②: 上顎長径 (上顎切歯間歯槽突起の唇側最突出部から前頭鼻骨縫合最前方部間距離)、③: 下顎長径 (下顎切歯間歯槽突起の唇側最突出部から下顎頭軟骨中心部までの距離)、④: 下顎高径 (下顎頭最上方部から下顎下縁平面に垂線を下ろした長さ)、⑤: 下顎角 (下顎角部最後方突出部と下顎頭最後方部を結ぶ線と下顎下縁平面との成す角) である。なお、長さの計測はノギスを用い、角度については分度器と定規を用いて計測を行った。計測は同一部位を 3 回計測し、計測値の平均をそれぞれの値とした。また、下顎長径、下顎高径、および下顎角に関しては、左右の値の平均値とした。統計学的検討には、t-検定 (Bonferroni adjustment) を用いた。

今回行った実験は全て米国 National Institutes of Health による "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" と、Stanford 大学による "Stanford Policy of the Use of Vertebrate Animals" に準じて行った。

実験結果

実験 1: 90 日齢時を除く全ての計測時において、PD 群では SD 群に比較し有意な体重の増加を示した (図 1)。

実験 2: Wake, NR, REM 別の 1 時間ごとの平均総和量でみたところ、SD において light period (明期: 睡眠

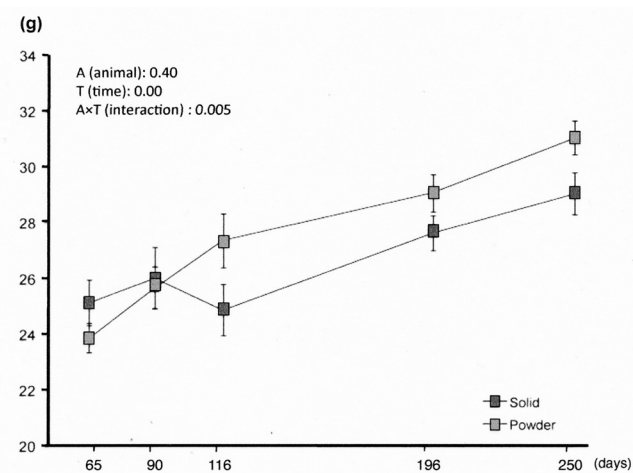


図 1 発育過程における体重変化
SD に比べ、PS の方が体重の増加が顕著に認められた。

期)でのNREM、およびdark period(暗期:活動期)でのWakeの有意な減少を認め、PDはSDに比べ睡眠/覚醒の概日変化が少なかった。また、24hrのWake、NR、REM別の総和はそれぞれ両群間に優位差はなかった(図2)。さらに、Wake、NREM、REMのMean Episode DurationおよびFFTパワー値は、light periodでのNREM Episodeは、PDの方が短く、総和量の比較において、light periodのNREMの総和量が有意に少なかった結果を反映している。一方、dark periodでは、PDのNREM Episodeが延長した(図3)。

実験3: Fasting sessionにおけるPD群の行動量および体温は、SD群に比較し有意に少なかった(行動量: $p=0.011$ 、体温: $p=0.013$)。また、各々の群別に、Baselineと

Fastingの一時間あたりのWakeの総量を比較すると、SDのdark periodにおいて顕著な差が見られた($p=0.042$) (図4)。さらに各々の群について、Wakeの1時間ごとの平均総和量を比較したところ、SDでは一日を通してほぼ優位に増加し($p=0.042$)、とくにdark periodでの増加が顕著であった($p=0.027$)。

一方、PDでは増加量が少なく($p=0.63$)、dark periodの初期にのみ増加が見られた。またSDは、絶食により、dark periodにおけるWakeの持続時間が優位に延長した(図5)。

実験4: SGZのそれぞれの領域における、BrdU標識細胞数を多群間比較検定したところ、PDにおいて有意に少なかった($p=0.007$)。領域別でも、MoDGで $p=0.03$ 、

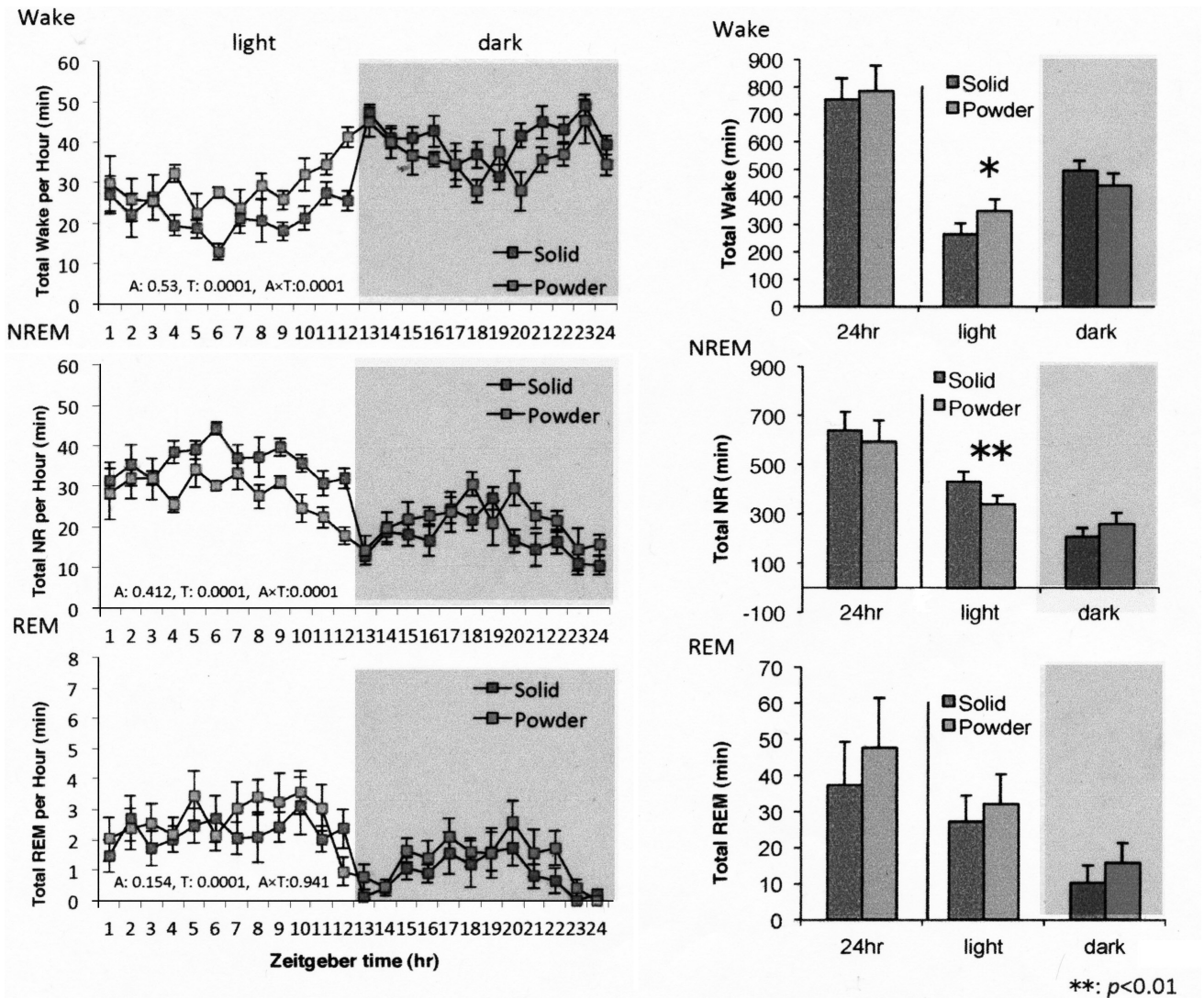


図2 Wake, NR, REM別の1時間ごとの平均総和量、および24hr、light period、dark periodにおける、Wake, NREM, REM別の総和量の比較。PDはSDに比べ睡眠/覚醒の概日変化が少ない。またLight periodにおいて、Wakeの総和量が多く、NREMは少ない。

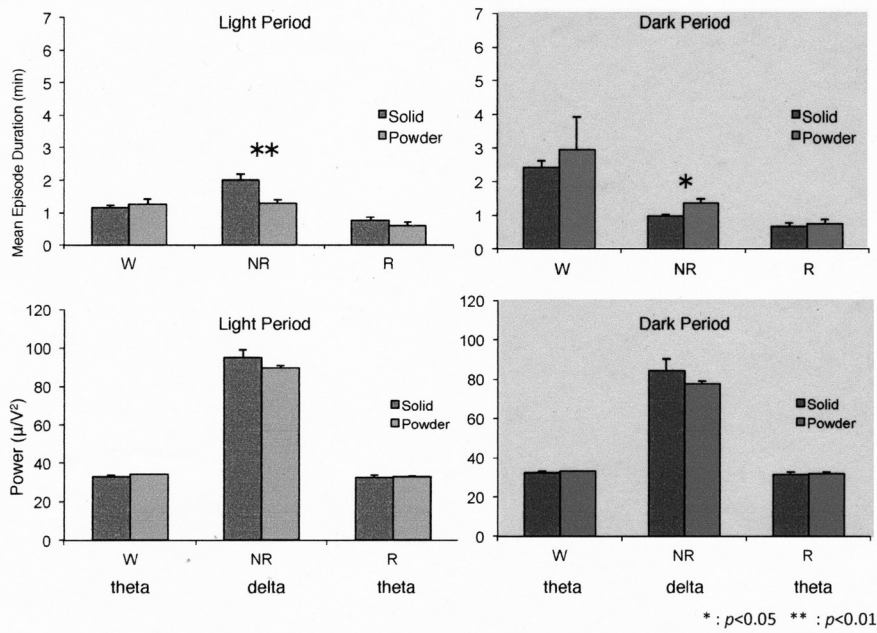


図3 Wake, NREM, REM の、Mean Episode Duration および FFT パワー値

light period での NREM Episode は、PD の方が短く、総和量の比較において、light period の NREM の総和量が有意に少なかった結果を反映している。一方、dark period では、PD の NREM Episode が延長した。

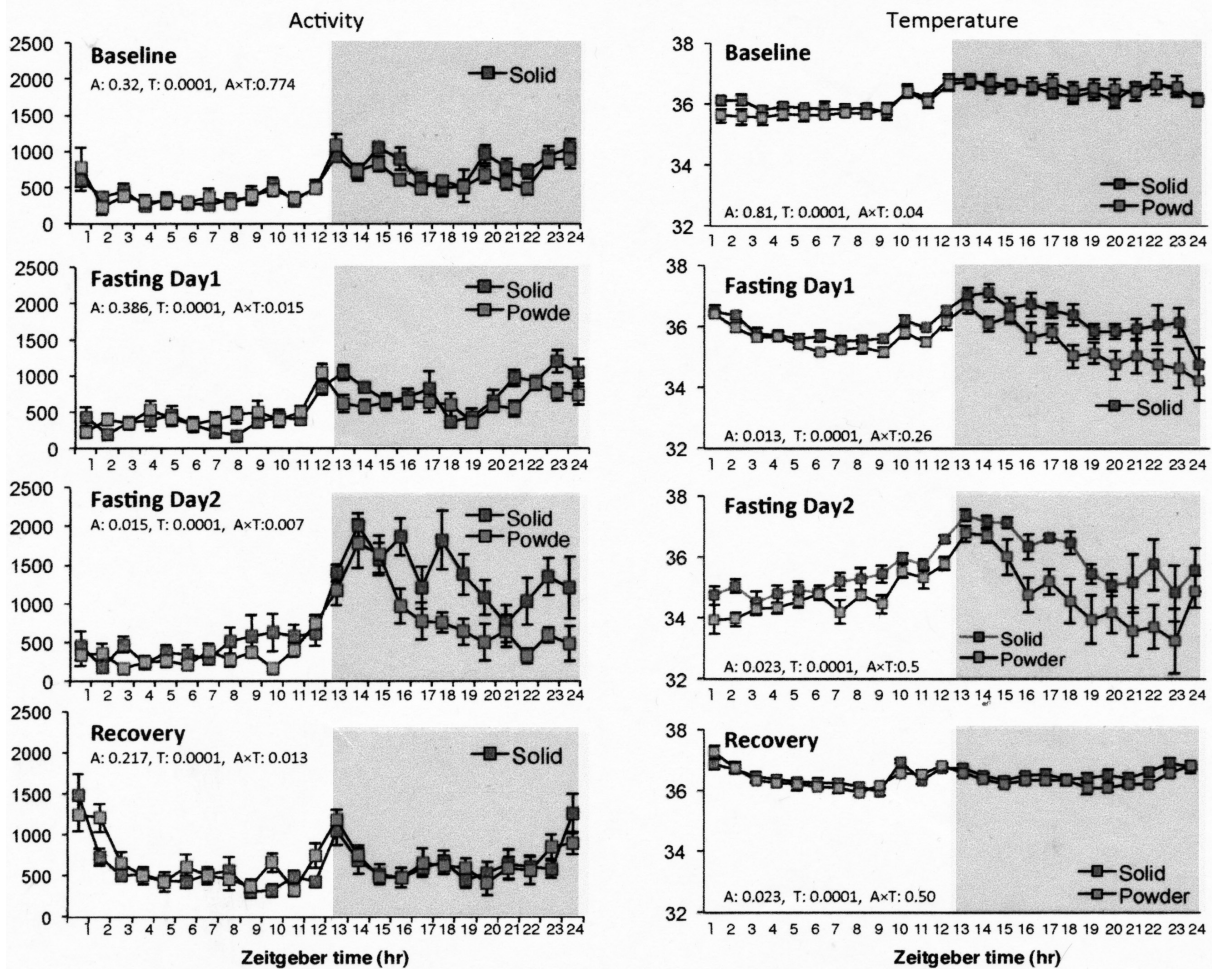


図4 48時間のfasting、およびrecoveryによる行動量と体温への影響

SDの行動量は、餌の探索行動により著しく増加した。一方、PDでは、SDに比べ行動量の増加量が少なく、体温の低下が著しい。

GrDG で $p=0.02$ となり、PoDG 以外の領域において PD では有意に少ない結果となった (図 6)。

実験 5: ①頬骨幅径: それぞれの平均は SD で 5.94 ± 0.08 、PD で 5.39 ± 0.09 となり、有意差を認めた ($p=0.002$) ②上顎長径: それぞれの平均は SD で 10.42 ± 0.15 、PD で 9.46 ± 0.28 となり、有意差を認めた ($p=0.009$)。③下顎長径: それぞれの平均は SD で 12.86 ± 0.18 、PD で 11.94 ± 0.23 となり、有意差を認めた ($p=0.004$)。④下顎高径: それぞれの平均は SD で 6.20 ± 0.12 、PD で 5.44 ± 0.13 となり、有意差を認めた ($p=0.001$)。⑤下顎角: それぞれの平均は SD で 102.56 ± 0.71 、PD で 105.38 ± 0.79 となり、各群間で有意差は認められなかった ($p=0.371$) (図 7)。

考 察

発育過程における長期的な咀嚼形態の変化は、概日リズム、成長発育、および脳機能に変化を与えた。PD での有意な体重の増加は、Watt⁵⁾ らの報告と一致した一方

で、Kiliaridis⁶⁾ らの報告とは相反するものであった。今回、マウスの頭蓋顔面の形態は SD で有意に大きかったことも体重増加の要因の一つであることが示唆され、さらに脳重量や骨格筋の重量も検討する必要があったと考えられる。9 月齢の別のマウスを用いた短期的な食事形状の変化では、睡眠脳波に影響はなかったが、長期的な咀嚼形態の変化は睡眠・行動パターンに有意な変化をもたらし、PD において light period での NREM、および dark period における Wake は減少しており、PD は SD に比べ、昼夜の睡眠 / 覚醒量の変化が少なくなっていた。また、絶食中の睡眠および行動量に顕著な減弱がみられたことより、これらの変化に中枢ヒスタミン神経伝達の変化の関与を含めた、睡眠および基本行動に影響を与える神経回路に影響を与えた可能性が考えられる。SGZ における新生神経細胞数は、PD で有意に少なく、発育過程における咀嚼機能の確立が、概日リズムのみならず、成熟マウスの脳機能の維持にも関与することが明らかとなった。よって咀嚼量の減少に起因する light period に

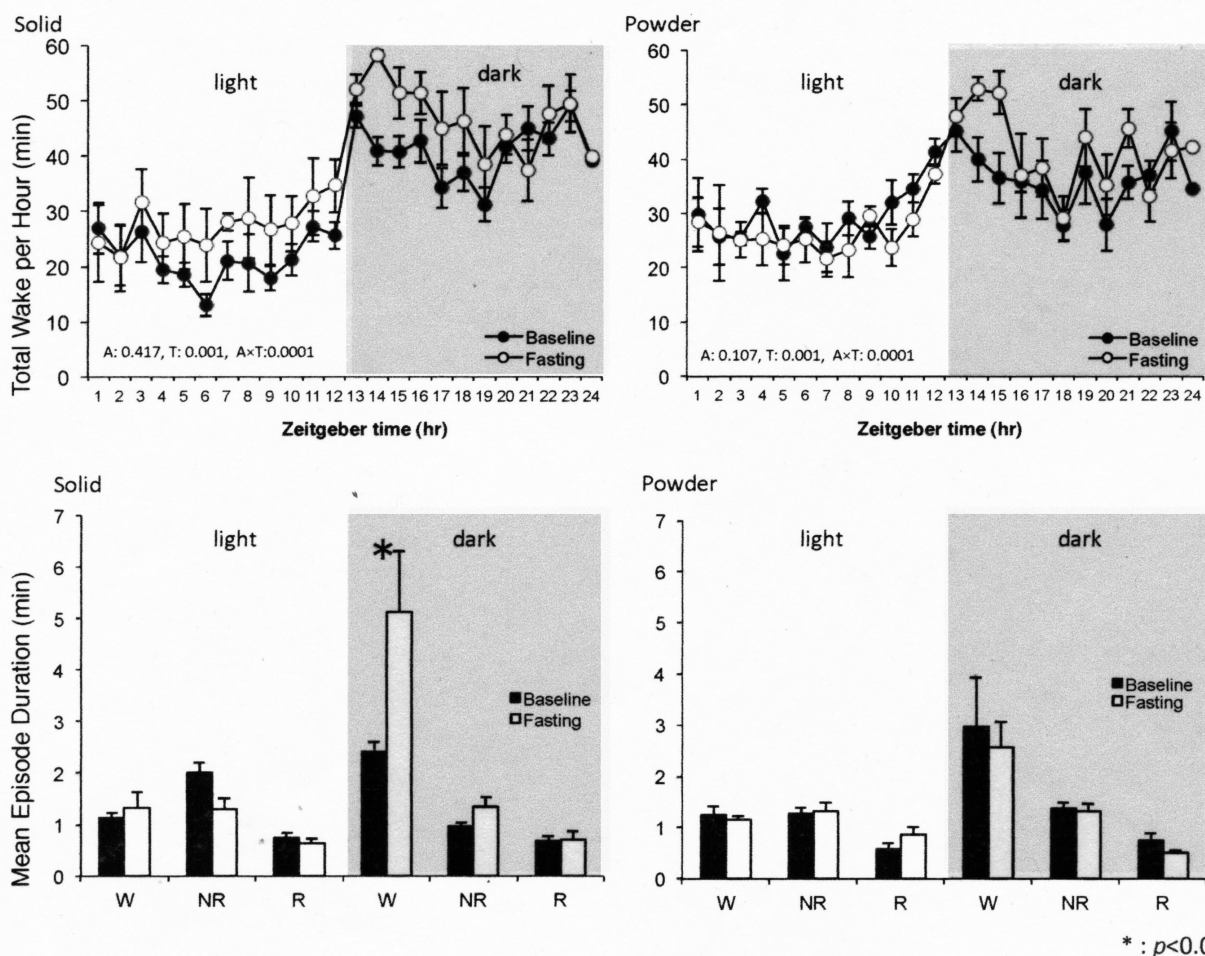
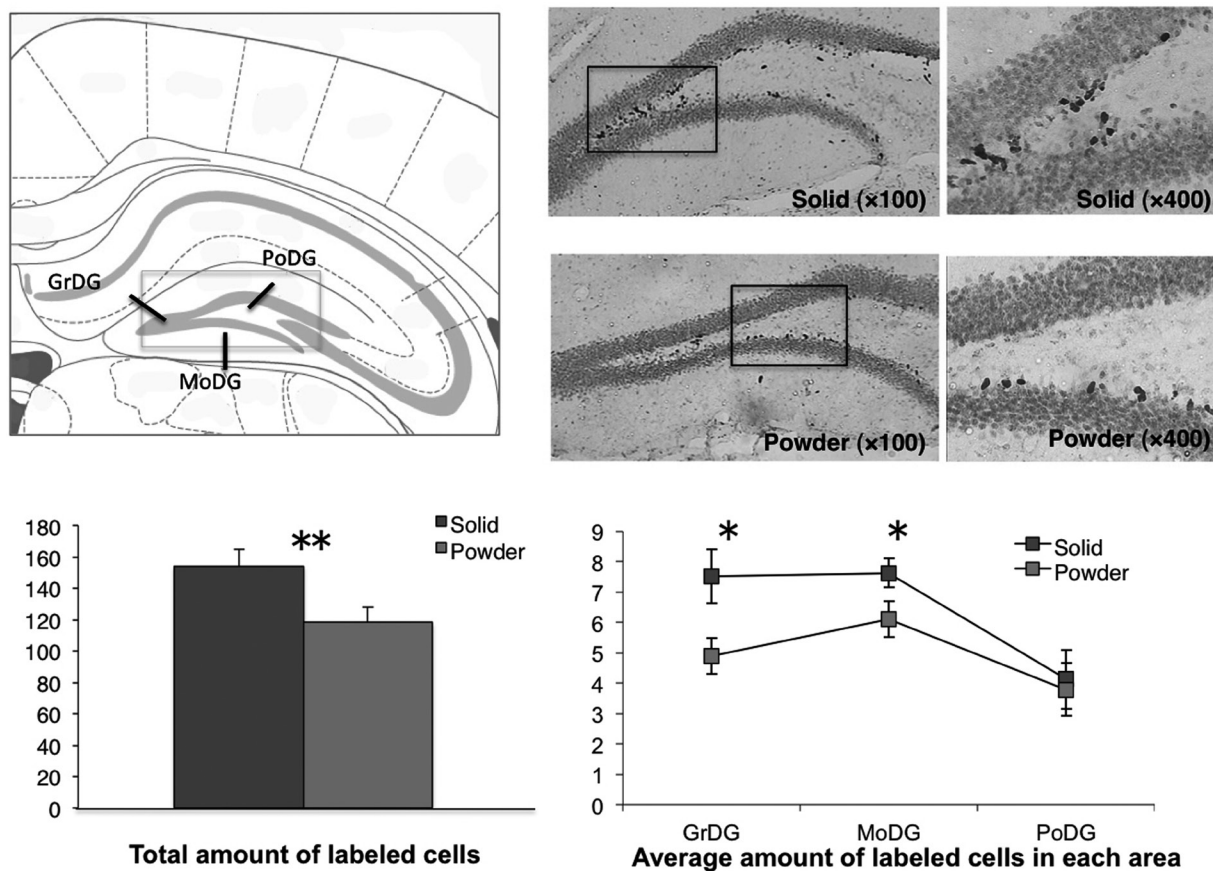


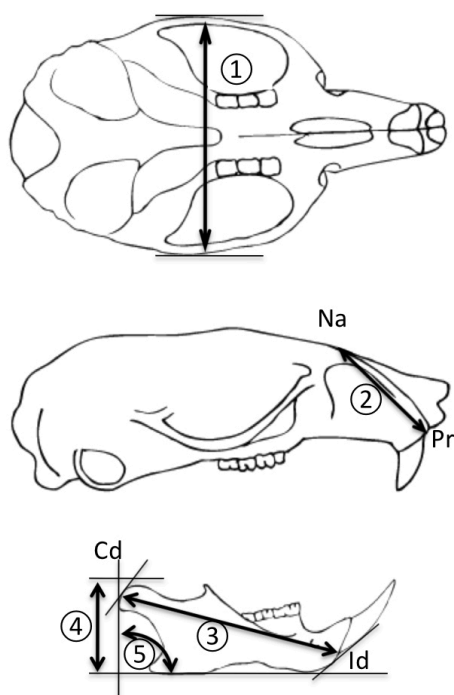
図 5 1 時間ごとの平均総覚醒量、および Wake, NREM, REM における Mean Episode Duration の、ベースラインと絶食 2 日目の比較



* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$

図6 海馬 (SGZ) の新生神経細胞数の比較

PDの標識細胞の総数は有意に少なく、領域別でも PoDG 以外の領域において有意に少ない。



Variable	Solid	Powder	P value (Bonferroni adjustment)	unit
①	5.94±0.08	5.39±0.09	0.002 *	mm
②	10.42±0.15	9.46±0.28	0.009 *	mm
③	12.86±0.18	11.94±0.23	0.004 *	mm
④	6.20±0.12	5.44±0.13	0.001 *	mm
⑤	102.56±0.71	105.38±0.79	0.371	Degree(°)

* : $p < 0.01$

- Na: A point on the nasofrontal suture
- Pr: The most inferior and anterior point on the alveolar process of the premaxilla
- Cd: condyion, most superodorsal point of condylar head
- Id: The most inferior and anterior point on the alveolar process of the mandible

図7 発育過程における顎骨形態の変化 (評価項目と結果)

おける睡眠量 (NREM)、および dark period における覚醒量 (Wake) の減少は、脳機能の破綻にもつながる可能性が示唆された。また発育過程において、食物形状のような環境要因を変化させると、顎骨などの咀嚼器官の形態に影響を及ぼすと考えられる。

要 約

以上の結果から、概して PD は生体に negative な影響を受けていたことが示唆される。本マウスはメタボリックシンドロームのモデルマウスになる可能性も秘めていると考えられ、今後これらの変化が咀嚼量 / 頻度の差によるものか、もしくは、摂食行動パターンの変化によるものかについて、交絡因子の更なる検討が必要である。さらに、咀嚼量 / 頻度の減少が、睡眠や行動に及ぼす影響が、どのように脳内ヒスタミン神経系などの脳機

能に関与しているか、その因果関係を解明することも重要な課題である。

謝 辞

本研究の遂行のために、公益財団法人三島海雲記念財団より研究助成を賜りましたことを深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Mitome M, et al.: *Neuroreport* 16, 249-252, 2005.
- 2) Onozuka M, et al.: *J. Dent Res.* 82 (8) , 657-660, 2003.
- 3) Sakata T, et al.: *Nutrition* 13, 403-411, 1997.
- 4) Fujiki N, et al: *Experimental neurology*, 217, 46-54, 2009.
- 5) WATT DG, WILLIAMS CH: *Am J Orthod.*, 37 (12) , 895-928, 1951.
- 6) Kiliaridis, et al: *Eur J Orthod.*, 7 (4) , 273-83, 1985.