

Thesis

睡眠時の末梢刺激応答性の変化に関わるグリシン受容体機構の検討

臨床医学研究系 口腔外科学

日野 峻輔

【目的】咀嚼筋などの顎周囲筋に生じる睡眠時の運動活性変化は、睡眠時無呼吸症候群や睡眠時ブラキシズムの発現に関与すると考えられているが、詳細な神経機構は未だ解明されていない。近年、サルの上顎運動活動性が睡眠時に減少することが報告され、脳幹部の抑制がその背景にあることが示唆された。脳幹部の三叉神経運動核は、錐体路からグルタミン酸性の、錐体外路からGABA性の入力を受けるが、これら上位中枢からの投射は、咀嚼筋運動神経だけではなく介在神経にも投射し複雑な神経回路を形成している。三叉神経運動核ならびにその周囲に存在する介在神経はグルタミン酸、GABAならびにグリシンなどを神経伝達物質として含むことから、本研究では咀嚼筋活動性を調節する三叉神経運動核の覚醒-睡眠サイクルに伴う活性変化とそれに関わるグリシン受容体機構を、薬物投与が容易に行えるラットを用いて検討した。

【方法】SD系雄性ラット（約5週齢）に心電図、筋電図（顎二腹筋前腹）、脳波、眼電図記録用電極と舌刺激用電極（オトガイ舌筋）を留置し、一週間の回復期間の後に実験に用いた。安静覚醒（QWB）時にオトガイ舌筋に電気刺激（200 μ s, 0.2 Hz, 5回）を加え、顎二腹筋活動を3/5以上で発現させる刺激強度を開口反射誘発閾値（Th）とし、誘発された顎二腹筋活動（反応潜時・活動持続時間・AUC）と併せて5分間隔で3回計測した。続いて、安静睡眠（QS）時とその後の覚醒（QWA）時も同様に観察した後、グリシン（75 mg/kg, 150 mg/kg, i.p.）を投与し同様の検討を行った。また、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。さらに、各ステージでの心拍数、顎二腹筋活動性、睡眠潜時ならびに睡眠時に発現するmicroarousalの発現頻度も測定した。

【結果】QWB時においてThは安定していたが、QS時ではThが有意に上昇し、QWA時ではQWB時のレベルまで戻った。また、QS時ではQWB時と比較して開口反射潜時の延長と顎二腹筋活動性の減少が各刺激強度で有意に認められた。グリシン投与によりQWB時のThは上昇したが、QS時のThには有意な変化は認められなかった。QS時ではQWB時と比較して開口反射潜時の延長を認めた。また顎二腹筋の自発筋活動が減少し、microarousalの発現頻度が用量依存的に有意に減少した。

【結論】睡眠時にラットの開口反射活性が抑制を受けることが示された。グリシンの投与は開口反射活性を、覚醒時には抑制し、睡眠時には亢進的に調節することが明らかになった。グリシンによる睡眠時の末梢刺激応答性亢進は、循環系を良好な状態に維持することに関与し、結果として睡眠改善効果をもたらしている可能性が示唆された。

緒言

睡眠時には筋緊張が低下する¹⁻⁴⁾ことから上肢などの反射が抑制される^{5,6)}。一方、睡眠時には脳幹部が抑制を受けるとされているが、三叉神経領域の反射活性に対する睡眠の影響は報告⁷⁻⁹⁾により様々である。近年、サルの上顎反射活性は睡眠時に有意に減少することが報告された⁴⁾。同報告では、サルの上顎

咀嚼野に微小電気刺激を与えることで発現する顎運動の誘発閾値が睡眠時には有意に上昇し、さらに、誘発される顎運動パターンが覚醒時には咀嚼運動様のリズムミカルな顎運動だが、睡眠時には開口運動のみに変化することを明らかにしている。覚醒時に皮質咀嚼野に入力された電気信号は錐体路ならびに錐体外路を経由して三叉神経運動核とその周囲毛様体に投射し、開口筋ならびに閉口筋運動神経を興奮させることで顎運動を発現している¹⁰⁻¹³⁾。顎運動が咀嚼運動様になるのは、パターンジェネレーターとして働く

医学博士 甲第1258号 平成26年3月28日（埼玉医科大学）

○著者は本学位論文の研究内容について他者との利害関係を有しません。

三叉神経運動核周囲毛様体¹⁴⁾からの興奮性ならびに抑制性の入力咀嚼筋運動神経にリズムカルに行われていることに依存している¹⁴⁻¹⁶⁾。これらから、顎運動発現機構は睡眠時に信号の入力部位である皮質、興奮伝播路である錐体路ならびに錐体外路、三叉神経運動核と周囲毛様体、そして咀嚼筋運動神経と咀嚼筋自体のいずれか、もしくは全ての興奮性が低下していることが示唆された。Massiminiら¹⁷⁾は、経頭蓋磁気刺激法にてヒト皮質に入力された刺激の皮質内伝播特性 (effective connectivity) を脳波にて解析している。その結果、覚醒時に皮質に入力された磁気刺激由来の神経興奮は約 300 ms 以内に全皮質に伝播するが、睡眠時には興奮は伝播せず約 120 ms 以内に消失してしまうことを明らかにした。さらに、睡眠時には、入力信号に対する刺激部位の反応性が覚醒時に比較して有意に上昇していた。これらのことは、サル顎運動発現抑制に関与するのは皮質局所の興奮性ではなく、投射路を含むより下位の神経回路であることを示している。三叉神経運動核ならびにその周囲毛様体は、皮質からの直接的なグルタミン酸性投射ならびに間接的な GABA 性投射を受けている¹⁸⁻²²⁾。そしてそれら上位中枢からの投射は咀嚼筋運動神経に直達するものも、介在神経に投射するものも存在する。介在神経は興奮性のグルタミン酸性²³⁾の他に、抑制性の GABA 性やグリシン性²⁴⁻²⁶⁾のものも存在し、それらが複雑な神経回路を構成して咀嚼筋運動神経の活動を調節していると考えられる。しかしながら、睡眠時に生じる三叉神経運動核や周囲毛様体の活動性変化と、それに関与する受容体機構の詳細は不明である。そこで本研究は、開口反射反応性を指標として、睡眠時に生じる顎運動発現機構の失調への咀嚼筋運動神経と咀嚼筋活動性の関与を検討した。また、咀嚼筋運動神経活動性の複雑な調節機構の中で、主に介在神経由来と考えられるグリシン²⁵⁾の開口反射反応性への影響を覚醒時ならびに睡眠時に検討した。

材料と方法

1. 開口反射誘発モデルの作成

約5週齢、体重 191.3 ± 6.2 g ($n = 15$)、雄性 Sprague-Dawley (SD) ラット (三協ラボ、東京、日本) を用いた。ラットは、恒温 ($24 \pm 2^\circ\text{C}$)、恒湿 ($55 \pm 5\%$)、12 時間明暗サイクル (7:00 点灯) 環境下で、摂食ならびに摂水は非制限で予備飼育の後、実験に用いた。なお、本研究は埼玉医科大学 (承認番号：第 1011 号) および明海大学歯学部 (承認番号：A1326) の実験動物倫理委員会の承認を得て実施した。

ラットは実験環境への馴化訓練の後、全身麻酔 (イソフルラン (5% : induction, 1-2% : maintain ; 1.0 L/min)) で一対のポリウレタンコーティングワイヤー (直径 0.12 mm, ユニークメディカル、東京、日本) を

それぞれ胸部正面 (心電図 (EKG) 用)、左右側顎二腹筋前腹内 (LAD, RAD : 筋電図 (EMG) 用)、オトガイ舌筋内 (GG : 電気刺激用 : 二対) に埋入した。筋肉内の電極の位置は、各電極対に電気刺激 (0.2 ms, 12 pulses, 333 Hz, 0.6-2 V) を与え、筋収縮にて確認した。麻酔深度は hind paw-withdrawal reflex を指標として維持し、体温は約 37°C に維持した (BWT-100, バイオリサーチセンター、大阪、日本)。切開部位には 1% リドカインを使用し局所麻酔を施した。

ラットを脳定位固定装置に移し、脳波 (EEG ; 前方 : bregma から吻側 1.0 mm, 右側 2.0 mm, 後部 : bregma から尾側 4.0 mm, 左右 4.0 mm) と眼電図 (EOG ; 左右眼窩上縁部) にステンレスワイヤーを溶接したステンレス製スクリューを頭蓋骨に固定した。記録時に各電極へのアクセスを容易にするため、全てのワイヤーをマイクロプラグに溶接し、頭蓋骨表面に歯科用レジンで固定した。手術後、ラットは一週間の回復期間ののち、実験に用いられた。

2. 開口反射記録手順と睡眠評価

ラットを観察用ケージ ($22 \times 30 \times 13$ cm) に入れ、計測用ケーブルをマイクロプラグに取り付け、明下にて 20 分間馴化させた。観察はすべて午前 9 時から 11 時の間に開始した。

EEG (bandpass filtered : 0.08-100 Hz), EOG (bandpass filtered : 0.08-100 Hz), EMG (bandpass filtered : 150-3 kHz) および EKG データは増幅 (AB-651J, 日本光電、東京、日本) しデジタル化 (6 kHz ; CED 1401 plus, Cambridge Electronic Design, Cambridge, UK) し、PC 内に保存した (Spike2 Ver.6, Cambridge Electronic Design)。

睡眠に関連する電気生理学的データ (EMG, EOG, EEG, EKG) は人間の標準的な睡眠評価基準^{1, 27)}と過去のげっ歯類の睡眠に関する研究^{2, 3)}に基づき、5 秒間隔で肉眼観察のデータと併せて評価し、以下の様に分類した (Sleepscore v1.01 script, Cambridge Electronic Design)⁴⁾。

覚醒状態 (QWB および QWA) : EEG の α - β 周波数帯支配、高い筋緊張、開眼状態、無動状態。

睡眠状態 : (1) quiet sleep (QS) : K-complex と sleep spindle を含み EOG 活動を伴わない大きな δ 波を伴う EEG, 中程度の EMG 活動, (2) レム睡眠 (REM) : θ 波 EEG の上昇, 低い EMG 活動および高い EOG 活動を有する。

さらに各ステージにおける心拍数の変化と睡眠を開始するまでの潜時 (睡眠潜時), 安静睡眠中に自発的に発現する microarousal の回数を測定した。

3. 覚醒時と睡眠時の開口反射の評価

安静覚醒時 (QWB1-3), オトガイ舌筋に埋入された電気刺激用ワイヤー 4 本のうち最も敏感に開口反射を誘発する 2 本を選択した。開口反射を評価するために、

オトガイ舌筋に電気刺激 (200 μ s pulse, 0.2 Hz, 5 回) を加え, 開口反射を誘発する閾値ならびに誘発された顎二腹筋活動の詳細 (反応潜時, 活動持続時間, area under the curve (AUC)) を 5 分以上の間隔で 3 回測定した. 次に, 開口反射誘発閾値の 1.5 倍ならびに 2 倍の強度の刺激を加え, 顎二腹筋の反応潜時, 活動持続時間, AUC を測定した (Fig. 1). その後, 自発睡眠下 (QS1-3) と, それに続く強制覚醒下 (QWA1-3) でも同様の検討を行った. QWB1 から QS1 までの間を睡眠潜時とした. 上記観察後, グリシン (75 mg/kg : n = 7, 150 mg/kg : n = 8, i.p.)²⁸⁾ を投与し, 同様に QWB 時, QS 時, QWA 時の開口反射を評価した. なお, 各生理的指標の記録状況によって, 顎二腹筋の自発筋活動性の解析は各群 n = 7, EEG スペクトル解析は各群 n = 6 として解析を行った.

4. 覚醒ならびに睡眠時の EEG スペクトル解析

EEG の解析は, 高速フーリエ変換プロファイルを使用し 4 つの周波数帯域のパワースペクトルを計算した. 解析に使用した各帯域の範囲は δ : 0.48-4 Hz,

θ : 4.25-8 Hz, α : 8.25-15 Hz, β : 15.25-35 Hz である. スペクトル解析は開口反射誘発電気刺激印加前の 5 秒間のエポックを対象として行い, 各行動ステージ (例えば QWB) の連続する 3 つ (例えば QWB1-3) 結果の平均値を算出し, 他の行動ステージ (例えば QS および QWA) のそれらと比較した. この際個体間の非特異的な差異を最小限に留めるために, 各周波数の EEG パワーはエポック内の合計 EEG パワーの割合として表した. グリシン投与後の EEG 変動にも同様の検討を加え, 薬物投与の影響も検討した.

5. データ分析

開口反射閾値は, それぞれの個体のグリシン投与前の QWB1 の値を基準として標準化した. グリシン投与前の開口反射反応潜時, 活動持続時間ならびに AUC は, 各行動ステージの平均値を算出し統計に用いた. また, グリシン投与後の反応潜時, 活動持続時間ならびに AUC は, 各行動ステージのグリシン投与前の閾値データを基準として標準化した. 数値は全て平均値 $\pm$ 標準誤差で表し, 多群比較には一元

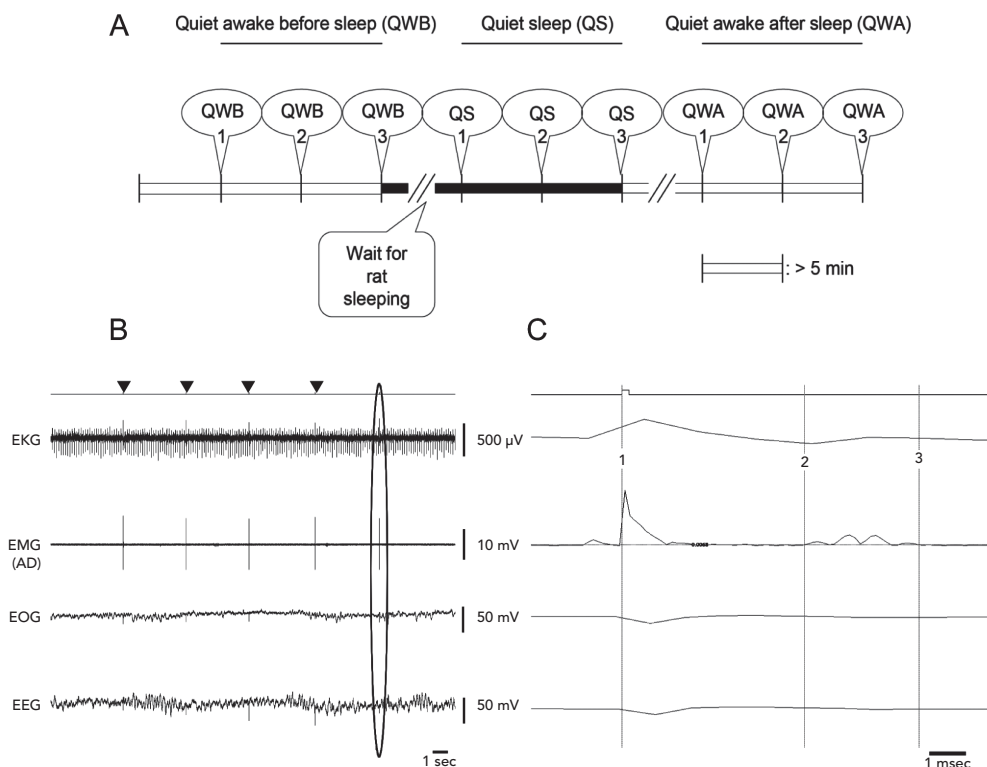


Fig. 1. Time course of experiment and representative data of jaw-opening reflex (JOR). A) Electrical stimulation was applied to genioglossal muscle for three times with at least 5 min interval at quiet awake before sleep (QWB1-3), quiet sleep (QS1-3) and quiet awake after sleep (QWA1-3). B) Five continuous electrical stimulations (arrowheads) were applied to evaluate the threshold intensity for inducing JOR with at least 5 sec interval. C) Magnified data of black circle in B. 1: Artefact of electrical stimulation. 2: Onset of electrical stimulation evoked muscle excitation of anterior digastric muscle. 3: Offset of electrical stimulation evoked muscle excitation of anterior digastric muscle (JOR). Periods between 1 and 2, and 2 and 3 were considered as latency and duration of JOR, respectively. EKG: electrocardiograph, EMG: electromyography, EOG: electrooculography, EEG: electroencephalograph.

配置分散分析ならびにBonferroni法 (*post hoc*) を用い、二群比較にはPaired t-testを用いて統計学的に評価した (Origin Pro 9.10, Origin Lab Corporation, MA, USA). 有意水準は $P < 0.05$ とした。

結 果

ラット睡眠時の生理学的特性の解析

明環境下の安静覚醒時 (QWB1-3) のEEGは、 δ 波 ($68.8 \pm 3.2 \%$), θ 波 ($22.9 \pm 2.0 \%$), α 波 ($8.6 \pm 1.0 \%$), β 波 ($5.7 \pm 0.7 \%$) (Fig. 3A) の分布を示し、その際の心拍数は 7.0 ± 0.1 回/sであった (Fig. 4A). また、顎二腹筋の活動を伴わない自発筋活動は 6.2 ± 1.0 mVであった (Fig. 5A). これらのラットは開口反射閾値を測定 (後述) された後、明環境下で自由行動が許されるが、徐々にグルーミングなどを含む自発行動量が減少し閉眼して無動状態になる。この状態で観察を継続するとEEGにK-complexならびにsleep spindleが発現し入眠が確認できる (Fig. 2). 各個体の睡眠に至るまでの睡眠潜時は 5489.6 ± 659.5 sであった (Fig. 6A). 睡眠時 (QS) のEEGは δ 波 ($72.3 \pm 3.7 \%$), θ 波 ($14.5 \pm 1.8 \%$), α 波 ($10.8 \pm 1.7 \%$), β 波 ($2.5 \pm 0.5 \%$) (Fig. 3A) の分布を示し、心拍数は 6.6 ± 0.1 回/s (Fig. 4A), 顎二腹筋の自発筋活動は 5.3 ± 0.9 mVであった (Fig. 5A). 睡眠時には眼球運動の発現、筋活動性の低下ならびに脳波の活性化を伴うREM睡眠と、自発的な筋活動性を伴うmicroarousalが認められ (Fig. 2), 発現頻度は 0.004 ± 0.001 Hzであった (Fig. 6B). 睡眠時の開口反射閾値測定の後、ラットは覚醒させられ、その際 (QWA) のEEGは δ 波

($61.7 \pm 2.5 \%$), θ 波 ($22.3 \pm 1.6 \%$), α 波 ($9.83 \pm 1.0 \%$), β 波 ($6.19 \pm 0.8 \%$) (Fig. 3A) の分布を示し、心拍数は 6.8 ± 0.1 回/s (Fig. 4A), 顎二腹筋の自発筋活動は 6.1 ± 1.0 mVであった (Fig. 5A).

ラットの開口反射特性と睡眠による興奮性変化

安静覚醒時の顎二腹筋前腹に開口反射を誘発するためのオトガイ舌筋への電気刺激閾値 (QWB1) は、各固体により様々 (460 – 1640 μ A) であった。しかしながら、QWB1に続いて計測したQWB2-3は各個体において安定しており、有意な変動は認められなかった ($P = 0.98$, $F(2, 51) = 0.02$; Fig. 7A). また、顎二腹筋の反応潜時 (3.9 – 7.0 ms) と活動持続時間 (2.0 – 5.6 ms) は、個体間ならびに刺激時間 (QWB1-3) において有意な差は認められず (反応潜時: $P = 0.91$, $F(2, 33) = 0.09$; 活動持続時間: $P = 0.99$, $F(2, 33) = 0.01$; Fig. 8A, D), それぞれ 5.2 ± 0.1 ms, 3.7 ± 0.2 msと安定していた。一方、AUC (2.1×10^{-2} – 0.2 mV $\times$ s/10) は個体間でばらつきはあるものの、QWB2-3は各個体において安定しており、有意な変動は認められなかった (AUC: $P = 0.71$, $F(2, 33) = 0.34$; Fig. 8G).

オトガイ舌筋への電気刺激の強度を閾値の1.5倍に増強すると、開口反射の反応潜時の有意 ($P = 6.35 \times 10^{-13}$) な短縮と、活動持続時間の有意 ($P = 6.03 \times 10^{-20}$) な延長、それに伴うAUCの増加傾向が認められた (Fig. 8B, E, H). しかしながら、刺激強度のさらなる増強 (2倍) は1.5倍刺激強度に比較して、有意な反応潜時の短縮、活動持続時間の延長とAUCの増加は示さなかった。

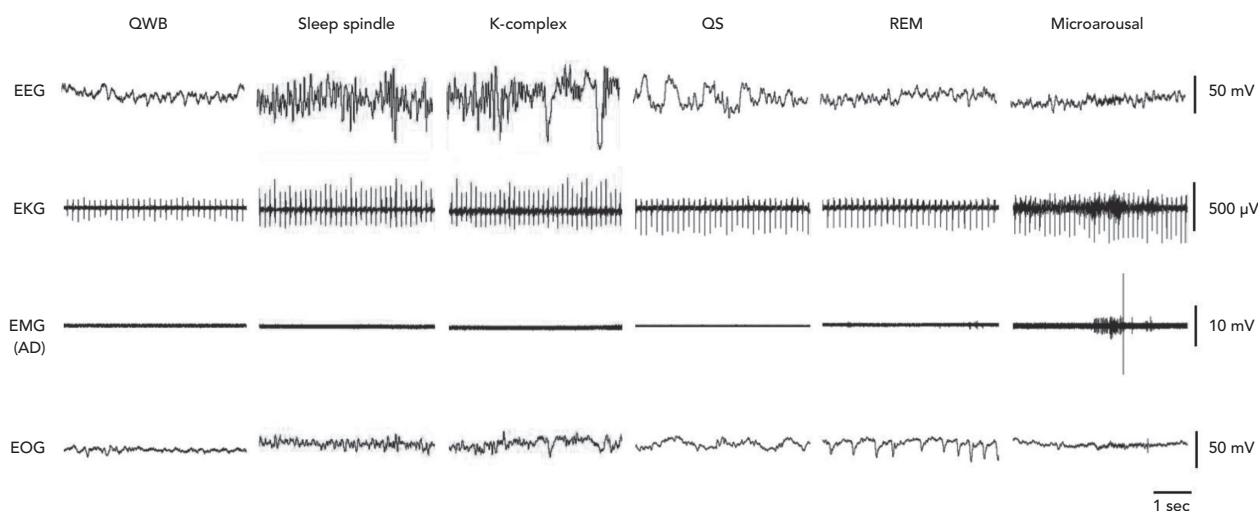


Fig. 2. Representative data of physiological features of jaw-opening reflex (JOR) during each behavioural stage and/or event. QWB: quiet awake before sleep, QS: quiet sleep, REM: rapid eye movement sleep, EEG: electroencephalograph, EKG: electrocardiograph, EMG: electromyography, AD: anterior digastric muscle, EOG: electrooculography.

睡眠 (QS1-3) によって開口反射誘発閾値はQWB時と比較して有意に上昇し ($P = 0.03$, $F(1, 70) = 5.23$; QWB vs QS: $P = 0.03$), その後覚醒 (QWA1-3) によって徐々に睡眠前の閾値まで低下した (Fig. 7A). QWBと比較して高電流値で誘発されているQS時の開口反射の反応潜時は有意 ($P = 3.00 \times 10^{-3}$) な延長を示した (Fig. 8A). 一方で, 活動持続時間ならびにAUCには有意な差は認められなかった (Fig. 8D, G). 刺激強度の上昇 (1.5倍) は, QS時においても閾値と比較して有意な反応潜時の短縮 ($P = 3.30 \times 10^{-11}$), 活動持続時間の延長 ($P = 4.10 \times 10^{-17}$) を示した (Fig. 8B, E). しかしながら, 刺激強度のさらなる増強 (2倍) は1.5倍刺激強度に比較して, 有意な反応潜時の短縮, 活動持続時間の延長とAUCの増加は示さなかった.

ラット睡眠時の生理学的特性へのグリシン投与の影響

グリシン (75, 150 mg/kg) 投与後, QWB時のラットのEEGは, 低用量 (75 mg/kg) の投与で δ 波 ($68.1 \pm 3.5\%$), θ 波 ($19.0 \pm 1.6\%$), α 波 ($7.4 \pm 1.3\%$), β 波 ($5.5 \pm 1.0\%$) の分布を示し, 高用量 (150 mg/kg) の投与で δ 波 ($61.9 \pm 1.9\%$), θ 波 ($21.3 \pm 1.6\%$), α 波 ($9.5 \pm 0.5\%$), β 波 ($7.2 \pm 0.3\%$) の分布を示した. それぞれをグリシン投与以前と比較すると, 低用量グリシンの投与で θ 波のみ有意な下降が認められた ($P = 4.99 \times 10^{-2}$, $F(2, 21) = 3.47$; w/o vs glycine 75 mg/kg: $P = 4.90 \times 10^{-2}$; Fig. 3B). 同様に, QS時ならびにQWA時のEEG分布を比較しても, 各周波数帯でグリシン投与による有意な変動は認められなかった (Fig. 3B, C). グリシンの投与は

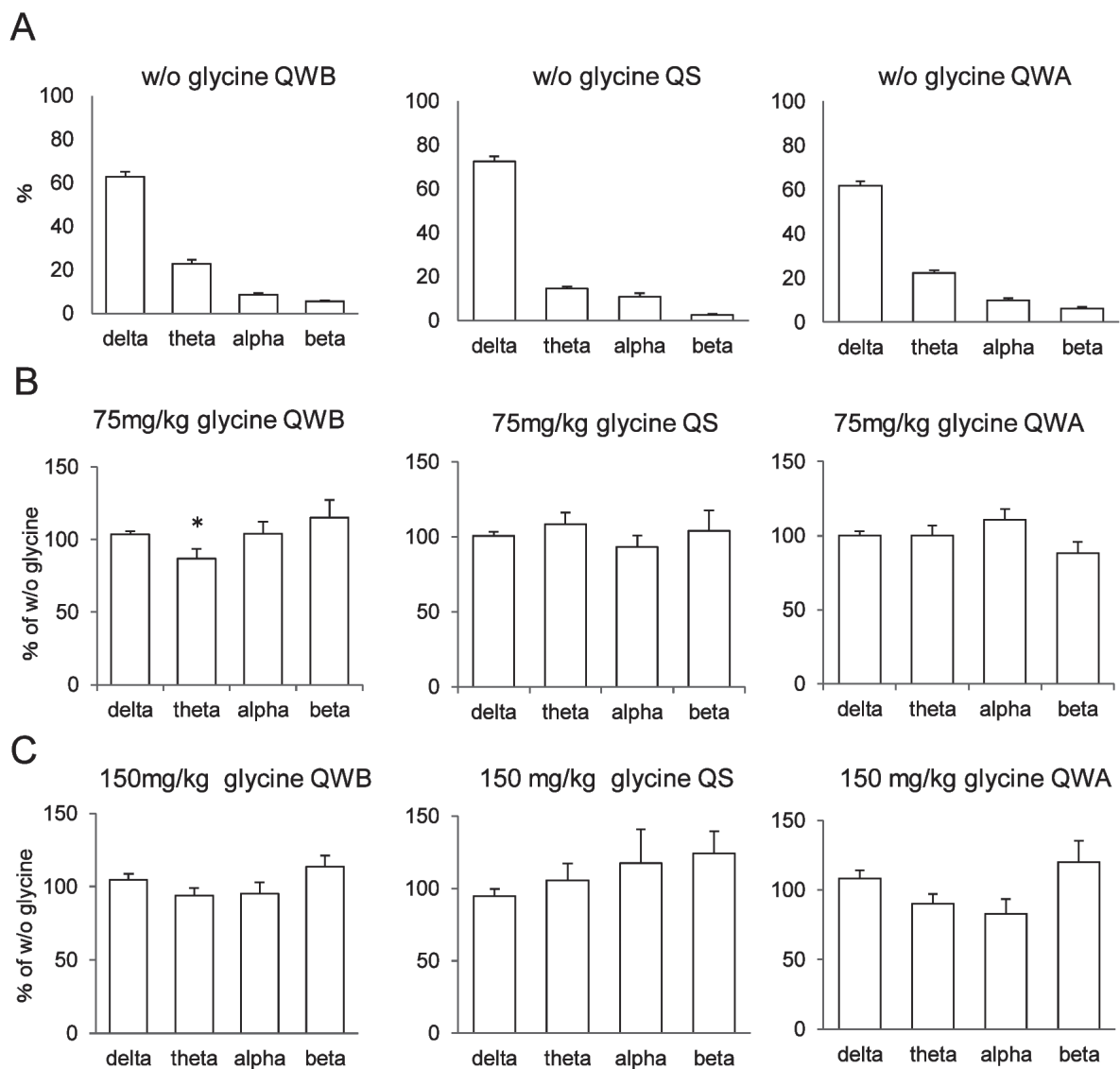


Fig. 3. Effect of glycine application on distribution of four frequency bands (δ , θ , α and β) of EEG in each behavioural stage. A) Before glycine injection. B) After glycine (75 mg/kg, i.p.) injection. C) After glycine (150 mg/kg, i.p.) injection. w/o: without, QWB: quiet awake before sleep, QS: quiet sleep, QWA: quiet awake after sleep. *: $P < 0.05$: vs without glycine (Bonferroni multiple t -test).

QWB, QSならびにQWA時の心拍数に有意な変動はもたらさなかった (75 mg/kg: $P = 0.40$, $F(2, 15) = 0.98$; 150 mg/kg: $P = 0.84$, $F(2, 15) = 0.18$; Fig. 4B, C). 顎二腹筋の自発筋活動は、低用量グリシン投与で、グリシン投与前と比較してQWBならびにQWA時に減少傾向を認めた。また、QS時には低用量グリシン投与後のQWBとQWA時と比較して分散で有意 ($P = 0.04$, $F(2, 18) = 3.86$; Fig. 5B) な増強が認められたが、*post hoc*による群間差に有意差は認めなかった。また、その活動性はグリシン投与前のQS時と同程度であった ($P = 0.05$, $F(2, 25) = 3.38$; Fig. 5B, C). 一方、高用量グリシン投与では、顎二腹筋の自発筋活動はいずれの行動ステージでも抑制を受けたが、特にグリシン投与前と比較してQWB時で有意な抑制が認められた ($P = 0.02$, $F(2, 25) = 4.3$; w/o vs glycine 150 mg/kg: $P = 0.03$; Fig. 5B). グリシンの投与によって、睡眠潜時は減少

傾向を示し ($P = 0.32$, $F(2, 21) = 1.2$), microarousalの発現頻度は用量依存的に有意に減少した ($P = 0.01$, $F(2, 21) = 5.67$; w/o vs glycine 150 mg/kg: $P = 0.01$; Fig. 6B).

ラット開口反射活性へのグリシン投与の影響

グリシンの投与は、開口反射誘発閾値を覚醒-睡眠のサイクルにおいて安定させた。つまり、グリシンの投与は、いずれの用量でも、QWB時の開口反射誘発閾値をグリシン投与以前と比較して上昇させたが、QSならびにQWA時においてもその閾値は有意に変動することがなかった (75 mg/kg: $P = 0.84$, $F(2, 60) = 0.18$; 150 mg/kg: $P = 0.85$, $F(2, 69) = 0.16$; Fig. 7B). また、グリシンの投与は、QWB時の開口反射誘発閾値刺激によって生じる顎二腹筋活動の反応潜時を有意に延長した (QWB: $P = 0.02$, $F(2, 69) = 4.03$; vs w/o: $P = 0.02$; Fig. 9A). しかしながら、QS時

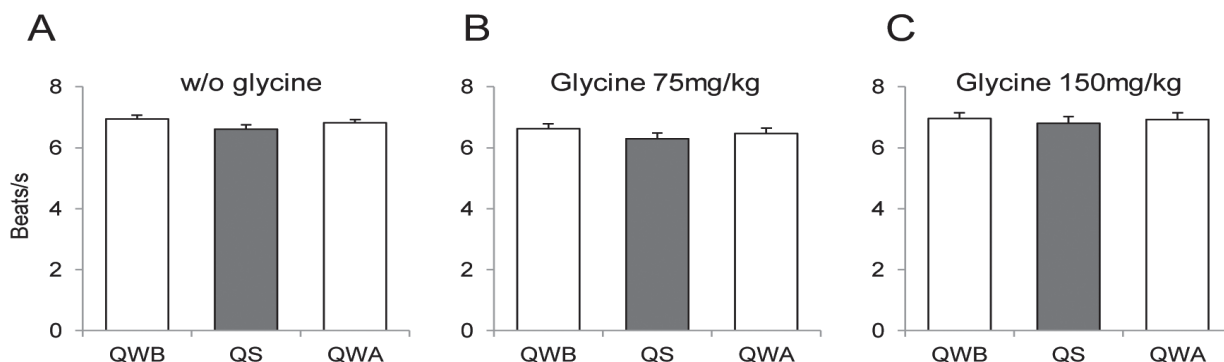


Fig. 4. Effect of glycine application on heart rate in each behavioural stage. A) Before glycine injection. B) After glycine (75 mg/kg, i.p.) injection. C) After glycine (150 mg/kg, i.p.) injection. w/o: without, QWB: quiet awake before sleep, QS: quiet sleep, QWA: quiet awake after sleep.

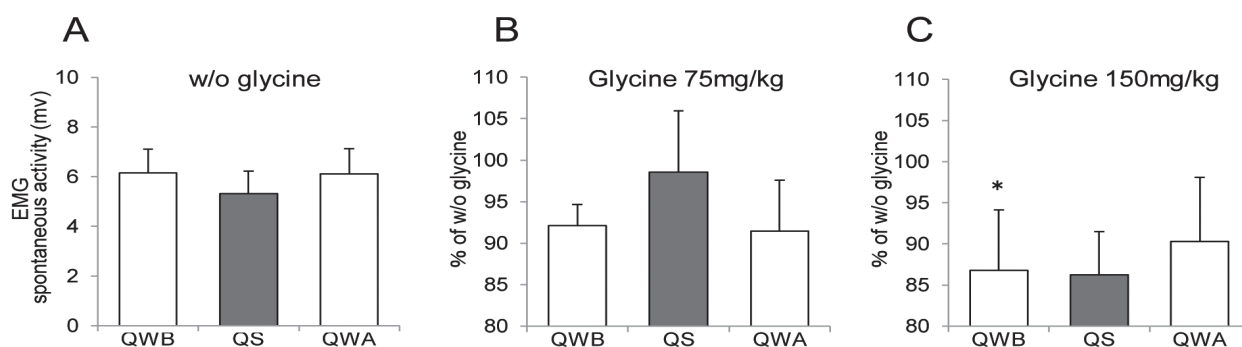


Fig. 5. Effect of glycine application on spontaneous anterior digastric muscle activity in each behavioural stage. A) Before glycine injection. B) After glycine (75 mg/kg, i.p.) injection. C) After glycine (150 mg/kg, i.p.) injection. w/o: without, QWB: quiet awake before sleep, QS: quiet sleep, QWA: quiet awake after sleep. *: $P < 0.05$: vs without glycine (Bonferroni multiple *t*-test).

ではグリシン投与前に比較して反応潜時の有意な延長は認められず (QS: $P = 0.37$, $F(2, 69) = 1.01$; Fig. 9A), QWA時では分散での有意差は認められるが, *post hoc*による群間差に有意差は認められなかった (QWA: $P = 0.02$, $F(2, 69) = 4.29$; Fig. 9A). 開口反射誘発閾値において, 顎二腹筋の活動持続時間はQWB, QS, QWA時のいずれの行動ステージにおいても, グリシン投与の有意な影響は認められなかった (活動持続時間: QWB: $P = 0.64$, $F(2, 69) = 0.44$; QS: $P = 9.95 \times 10^{-1}$, $F(2, 69) = 0.01$; QWA: $P = 0.65$, $F(2, 69) = 0.43$; Fig. 9D). また, AUCはQWA時に分散に有意差が認められた (QWB: $P = 0.21$, $F(2, 69) = 1.60$; QS: $P = 0.31$, $F(2, 69) = 1.21$; QWA: $P = 0.04$, $F(2, 69) = 3.48$; Fig. 9G)が, *post hoc*による群間差に有意差は認められなかった. また, オトガイ舌筋への電気刺激の強度を閾値の1.5倍に増強すると,

グリシン投与前に比較してQWB時の反応潜時が高用量グリシンで有意 (w/o vs glycine 150 mg/kg: $P = 0.04$) に延長したが, 活動持続時間ならびにAUCに影響は認められなかった (反応潜時: QWB: $P = 4.90 \times 10^{-2}$, $F(2, 69) = 3.14$; QS: $P = 0.78$, $F(2, 69) = 0.25$; QWA: $P = 0.30$, $F(2, 69) = 1.22$, 活動持続時間: QWB: $P = 0.14$, $F(2, 69) = 2.03$; QS: $P = 0.18$, $F(2, 69) = 1.75$; QWA: $P = 0.53$, $F(2, 69) = 0.64$, AUC: QWB: $P = 0.62$, $F(2, 69) = 0.48$; QS: $P = 0.17$, $F(2, 69) = 1.82$; QWA: $P = 0.73$, $F(2, 69) = 0.32$; Fig. 9B, E, H). また刺激強度閾値の2倍に増強すると, グリシン投与前に比較してQWB時の反応潜時が高用量グリシンで有意 (w/o vs glycine 150 mg/kg: $P = 0.02$) に延長し, QS時の活動持続時間とAUCが低用量グリシンで有意 (活動持続時間: w/o vs glycine 75 mg/kg: $P = 0.02$; AUC: w/o vs glycine 75 mg/kg: $P = 0.04$) に減少した

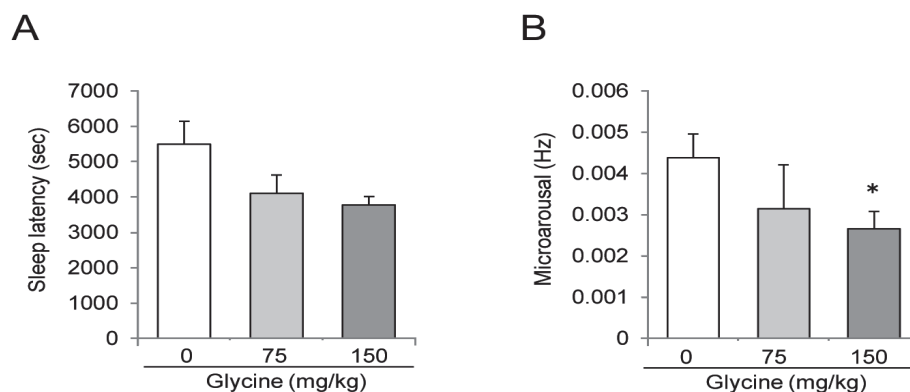


Fig. 6. Effect of glycine application on sleep latency (A) and incidence of microarousal during quiet sleep (QS) (B). *: $P < 0.05$: vs without glycine (Bonferroni multiple t -test).

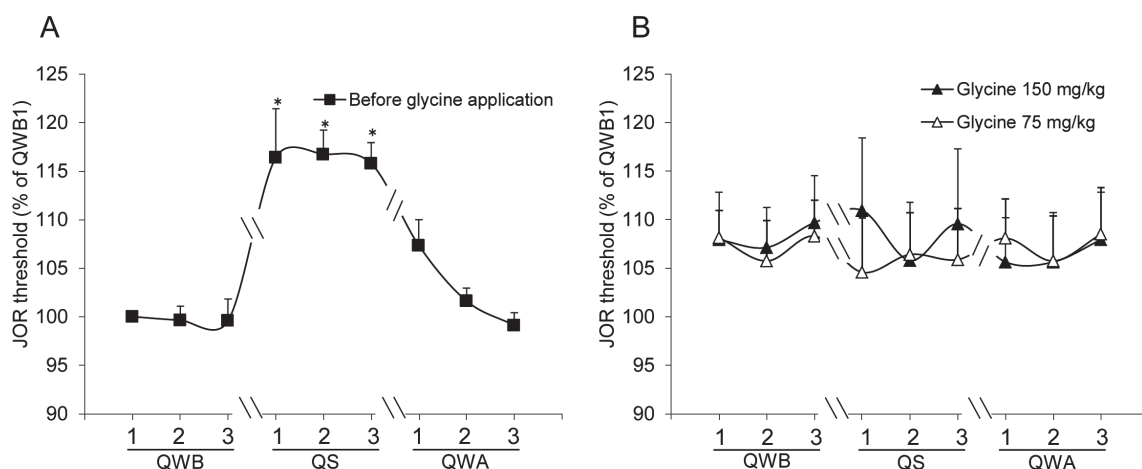


Fig. 7. Alteration of the threshold for evoking jaw-opening reflex (JOR) across sleep before (A) and after (B) glycine application. QWB: quiet awake before sleep, QS: quiet sleep, QWA: quiet awake after sleep. *: $P < 0.05$: vs QWB1 (Bonferroni multiple t -test).

(反応潜時: QWB: $P = 0.02$, $F(2, 69) = 4.03$; QS: $P = 0.18$, $F(2, 69) = 1.77$; QWA: $P = 0.80$, $F(2, 69) = 0.22$, 活動持続時間: QWB: $P = 0.10$, $F(2, 69) = 2.35$; QS: $P = 0.04$, $F(2, 69) = 3.40$; QWA: $P = 0.67$, $F(2, 69) = 0.40$, AUC: QWB: $P = 0.22$, $F(2, 69) = 1.55$; QS: $P = 0.02$, $F(2, 69) = 4.31$; QWA: $P = 0.51$, $F(2, 69) = 0.68$; Fig. 9C, F, I).

考 察

ラットの睡眠時における生理学的特性

ラットのEEGは、覚醒時から δ 波が高頻度に認められるものの、QS時には δ 波のさらなる上昇、

θ 波の減少、 α 波の上昇と β 波の減少を認めた。また、入眠時にはK-complexとsleep spindleの発現を認め、REM睡眠時には活発なEOG活動とEEGの振幅減少というヒトと同様のパターンを示した。心拍数もヒト¹⁾やサル⁴⁾と同様に睡眠時には減少することが確認された。これらは、EEG、EOGならびに心拍数の解析によって、ラットの入眠を確認し、睡眠をREMならびにnon-REM (QS) に分類することが可能であることを示している。一方、顎二腹筋の自発筋活動は覚醒-睡眠サイクルで減少は示すが、REM睡眠時にはQS時に比較して亢進した。これは、姿勢維持筋(頸部筋など)からEMGを採取しているヒト¹⁾や動物²⁻⁴⁾の

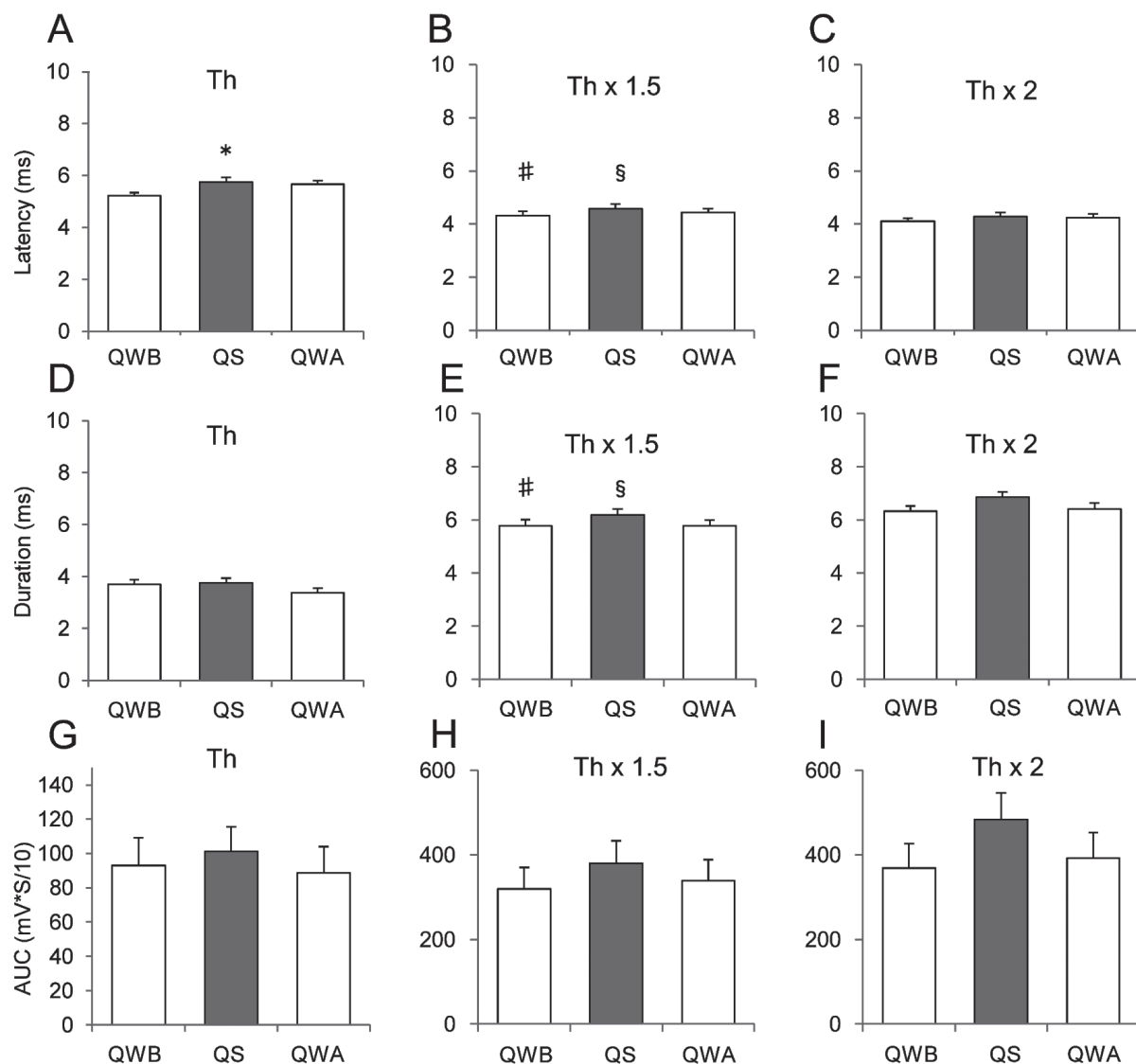


Fig. 8. Physiological features of threshold and/or suprathreshold stimulation-evoked jaw-opening reflex (JOR) in each behavioural stage. Th: threshold, AUC: area under the curve, QWB: quiet awake before sleep, QS: quiet sleep, QWA: quiet awake after sleep. *: $P < 0.05$; vs QWB of threshold (Paired t -test), #: $P < 0.05$; vs QWB of threshold (Paired t -test), §: $P < 0.05$; vs QS of threshold (Paired t -test).

報告と異なる。この背景には、顎二腹筋は姿勢維持筋ではなく、筋紡錘もほとんど存在しない^{29, 30)}ことが考えられ、睡眠指標としては不適であることが示された。しかしその一方で、咀嚼筋の中でも少なくとも開口筋の顎二腹筋の睡眠時活動抑制は強固なものではないことから、睡眠時のリズムカルな顎運動の発現抑制⁴⁾に大きく関与していない可能性が示唆された。**開口反射モデルによる覚醒-睡眠サイクルの感覚受容変動解析の有効性**

一般的な開口反射誘発モデルでは、開口反射誘発刺激は下歯槽神経^{31, 32)}や歯髄³³⁻³⁵⁾に与えられる。神経組織への刺激電極の留置はそれ自体が疼痛刺激になり、加えて、神経組織の直接刺激は多くの二次求心性繊維を活性化させ、痛覚情報が帯状回、島皮質、一次体性感覚野などの皮質を活性化することが考えられる。これは、口腔内疼痛が

運動制御や睡眠に及ぼす影響を解析する上では非常に有益であるが、咀嚼筋の末梢刺激応答性に関する覚醒-睡眠サイクルの影響を他の因子から切り離して検討を行う本研究への応用が困難であることを示している。そこで、刺激電極を軟組織に留置することで組織侵襲を最小限にとどめ、かつ、開口反射誘発刺激が覚醒-睡眠サイクルに影響を与えない⁴⁾ことが確認されているオートガイ舌筋刺激誘発開口反射モデルを本研究では選択した。オートガイ舌筋刺激モデルの場合、開口反射誘発電気刺激は筋肉組織を経由して舌神経、舌咽神経などを興奮させ三叉神経運動核ならびにその周囲に存在する介在神経に投射すると考えられる^{24, 26, 36)}。そのため、神経刺激モデルと異なり、刺激電極の刺入位置によって標的神経繊維へ十分な刺激を与えるための刺激強度が異なってくる。本研究にて、開口反射誘発閾値に個体間のばらつきが

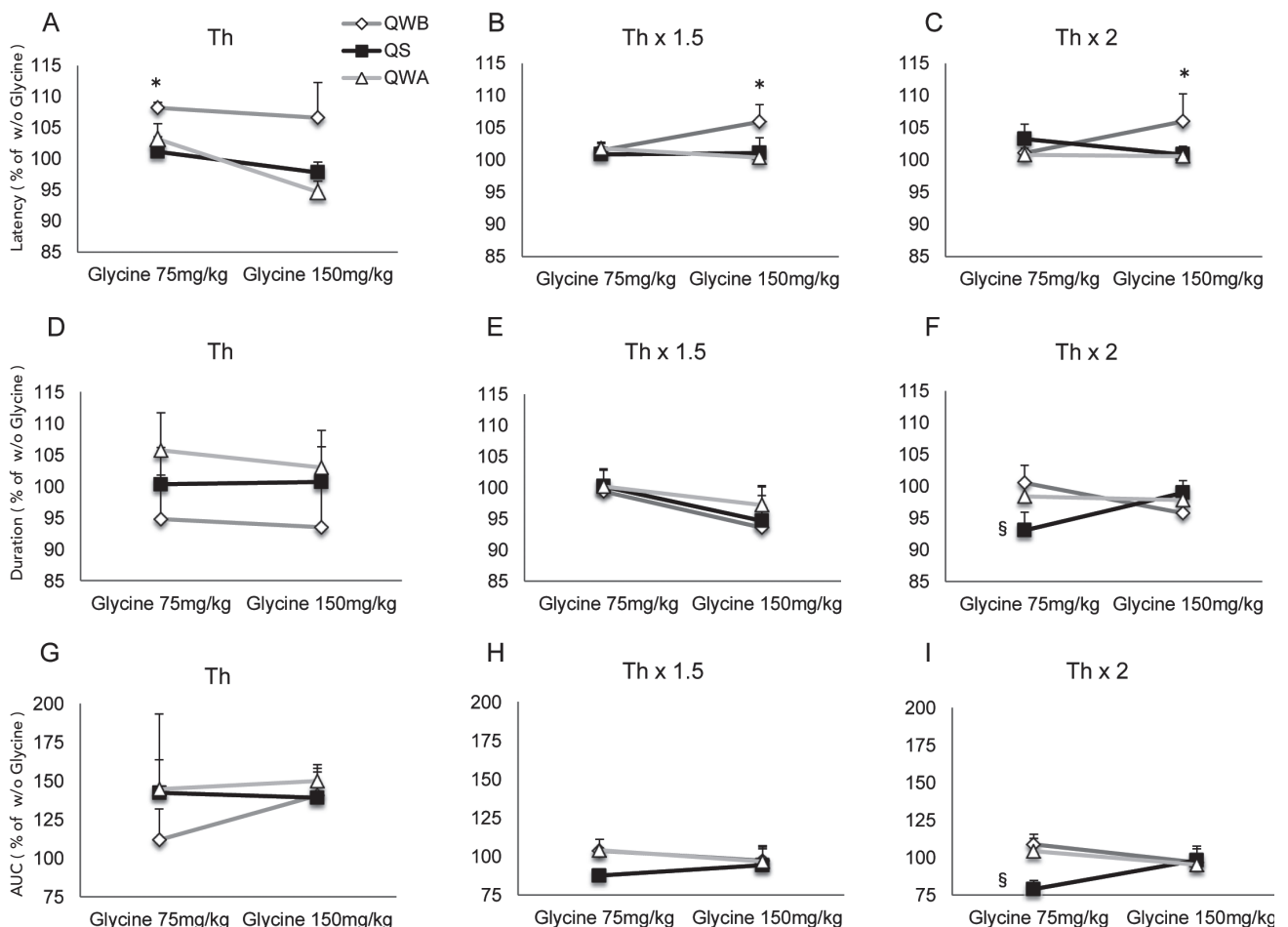


Fig. 9. Effects of glycine application on physiological features of threshold and/or suprathreshold stimulation-evoked jaw-opening reflex (JOR) in each behavioural stage. Th: threshold, w/o: without, AUC: area under the curve, QWB: quiet awake before sleep, QS: quiet sleep, QWA: quiet awake after sleep. *: $P < 0.05$: vs without glycine (Bonferroni multiple t -test), §: $P < 0.05$: vs without glycine (Bonferroni multiple t -test).

存在したのは、そのためと考えられる。しかしながら、同一個体においては同一行動ステージ（例えばQWB）内で閾値は安定していたことから、覚醒-睡眠サイクルや薬物投与下における運動発現活性を検討するための有益な指標となることが示され、事実本研究においてもQS時に開口反射誘発閾値がQWB時と比較して有意に上昇した。開口反射誘発閾値刺激時に発現する顎二腹筋の反応潜時と活動持続時間は個体間、行動ステージ間で大きな変動は認められなかった。このことは必要十分な強度の刺激（閾値）が入力された際に個体間ならびに行動ステージ間で安定した反射が誘発されていることを示している。EMG記録は同一の筋活動でも記録電極の刺入部位によって振幅が大きく異なり、刺激強度に比例して振幅が大きくなる特性がある^{10, 11, 37)}。そのため、閾値刺激で発現する安定した開口反射であっても顎二腹筋活動のAUCには個体間のばらつきが存在したが、QS時ならびに覚醒直後のQWA時ではQWB時に比較して高電流刺激が加えられているため、それぞれの行動ステージでQWB時に比較して増加傾向を示した。

QWB時に開口反射誘発刺激を閾値の1.5倍にすることで、反応潜時の短縮、活動持続時間の延長、AUCの増加が認められたことから、ラットの開口反射もサルなど^{4, 31-33, 35)}と同様に刺激強度依存性に増強された。また、増強効果は閾値の1.5倍でプラトーに達することが示された。QSならびにQWA時においても開口反射誘発刺激を閾値の1.5倍にすることでQWB時に比較して、反応潜時の短縮、活動持続時間の延長、AUCの増加が認められ、各指標において行動ステージ間での差が減少した。これは睡眠時においても開口反射は刺激強度への反応性が保存され、かつ、高電流刺激によって覚醒時と同程度に反応が可能であることを示している。開口反射が有害刺激に応答する反射でもある事を考えれば、気道に連絡する口腔内の反射興奮性を睡眠時でも可及的に保存することは非常に重要であると思われる。加えてこの結果は、睡眠改善効果が期待できる薬物を本モデルに適用し、候補薬物による過剰な反射抑制の有無ならびに程度を検討することにも有効であることを示している。

グリシンの睡眠改善効果

グリシンの投与は過去の報告²⁸⁾と同様に睡眠潜時の短縮傾向を示した。グリシンは末梢投与後に速やかに脳脊髄液に移行する²⁸⁾ことから、この効果は中枢グリシン受容体機構^{2, 3, 18, 28, 38, 39)}を介していると考えられるが、EEGの帯域分布には有意な差は認められなかったことから、皮質活動性への影響は少ないことが示された。心拍数もグリシン投与による著明な影響を受けないが、睡眠中に血中酸素飽和度の減少に伴い酸素供給を促進させる防御機構として

発現するmicroarousal⁴⁰⁾の発現頻度はグリシンの投与で用量依存的に有意に抑制された。これらから、グリシン受容体刺激は皮質活動性へ大きな影響を与えず入眠を促し、睡眠中は循環系を良好な状態に維持していることが示唆された。一方、睡眠潜時の短縮やmicroarousalの減少は単に骨格筋の活動抑制によって生じている可能性もある。しかし、後述するようにグリシン投与後でも睡眠時に開口反射活性は保存されることから、グリシン受容体刺激による骨格筋活性の抑制は睡眠潜時の短縮には関与するが、microarousalの発現抑制には関与しないものと考えられる。

開口反射活性に関与するグリシン受容体機構

グリシンの投与によって、開口反射の閾値はグリシン投与前のQWB時に比較して、いずれの投与用量でも、いずれの行動ステージにおいても約110%の上昇を認めた。この背景に顎二腹筋の筋活動性低下が関与するかを検討したところ、QWB時で反応潜時のみ有意な延長がグリシン投与によって認められたが、活動持続時間ならびにAUCでは有意な変動は認められなかった。この結果は、グリシン投与は覚醒時の開口反射の反応性を低下させるが、発現する筋活動自体は抑制していないことを示している。しかしながら、低用量グリシン投与はQS時に閾値の2倍の刺激への反応性（活動持続時間およびAUC）がグリシン非投与時と比較して減少していることから、グリシン受容体刺激は顎二腹筋の自発活性とともに過剰興奮を抑制している可能性も示唆された。その一方で、高用量では、低用量で認められた顎二腹筋の反応抑制が消退している。グリシンはNMDA受容体コアゴニストとして作用する^{41, 42)}ことから、高用量では抑制性伝達のみならず、興奮性伝達も一様に賦活化する可能性が考えられる。

グリシンの投与がQS時の開口反射閾値をQWBならびにQWA時と同レベルに維持したことは、睡眠時にグリシン受容体を刺激することでグリシン非投与時に比較して開口反射誘発閾値が低下していることを示している。さらに、QS時の閾値誘発開口反射の反応潜時、持続時間ならびにAUCはグリシン非投与時と比較して有意な変動が認められないことから、開口反射活性は抑制を受けていないことが明らかになった。

開口反射を誘発する口腔内刺激は、三叉神経運動核ならびに周囲毛様体などに存在するグリシンならびにGABA_A性介在神経^{24, 43-45)}を介してdisynapticに開口筋運動神経と閉口筋運動神経にそれぞれ入力する^{24, 26, 43)}。このとき、開口筋運動神経にはグルタミン酸受容体やノルアドレナリン受容体を介してEPSPs (excitatory postsynaptic potentials) が生じ²³⁾、閉口筋運動神経にはグリシン受容体を介した早期IPSPs (inhibitory postsynaptic potentials) とGABA_A受容体を介した後期IPSPsが生じる^{23, 24, 26)}ことで一過性の開口運動が可能と

なる。これに加えて、近年、開口筋運動神経にも上三叉神経核からのグリシンならびにGABA_A性介在神経の投射が存在することが明らかになり^{25, 46)}、本研究の結果で得られたグリシン投与による顎二腹筋の自発活動性低下と開口反射誘発閾値上昇はこれらの神経機構を介して発現していると考えられる。

結 論

睡眠時に三叉神経運動核は興奮性を制限されており、その結果、顎二腹筋の反射応答性が抑制されることが明らかになった。開口反射反応性はグリシン投与によって覚醒時には抑制的、睡眠時には促進的に調節を受けた。この複雑な調節機構は、覚醒時には末梢刺激応答性を減少させることで睡眠潜時を短縮し、睡眠時には末梢刺激応答性を上昇させることで循環系を良好な状態に維持し、睡眠改善効果を発現している可能性が示唆された。

謝 辞

大学院における研究活動において、代表指導教員として終始ご指導ご鞭撻を頂きました。埼玉医科大学総合医療センター歯科口腔外科 下山哲夫教授に心より感謝申し上げます。

本研究の実施、分析についてご指導頂きました。埼玉医科大学総合医療センター歯科口腔外科 堀江憲夫准教授に感謝申し上げます。

また、本研究における研究手法ならびに論文作成にあたりご指導頂きました。明海大学歯学部病態診断治療学講座薬理学分野 安達一典准教授、坂上宏教授には、ひとかたならぬお世話になりました。謹んで感謝申し上げます。また、本研究は、財団法人小貫基金研究開発助成金の援助のもと行われました。

引用文献

- 1) Iber C, Ancoli-Israel S, Chesson A, Quan SF. The American Academy of Sleep Medicine Manual for the scoring of sleep and associated events: rules, terminology and technical specifications. Westchester: American Academy of Sleep Medicine 2007.
- 2) Brooks PL, Peever JH. Impaired GABA and glycine transmission triggers cardinal features of rapid eye movement sleep behavior disorder in mice. *J Neurosci* 2011;31:7111-21.
- 3) Brooks PL, Peever JH. Identification of the transmitter and receptor mechanisms responsible for REM sleep paralysis. *J Neurosci* 2012;32:9785-95.
- 4) Yao D, Lavigne GJ, Lee JC, Adachi K, Sessle BJ. Jaw-opening reflex and corticobulbar motor excitability changes during quiet sleep in non-human primates. *Sleep* 2013;36:269-80.
- 5) Eisele DW, Smith PL, Alam DS, Schwartz AR. Direct hypoglossal nerve stimulation in obstructive sleep apnea. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1997;123:57-61.
- 6) Sandrini G, Milanov I, Rossi B, Murri L, Alfonsi E, Moglia A, et al. Effects of sleep on spinal nociceptive reflexes in humans. *Sleep* 2001;24:13-7.
- 7) Baldissera F, Broggi G, Mancina M. Monosynaptic and polysynaptic spinal reflexes during physiological sleep and wakefulness. *Archives italiennes de biologie* 1966;104:112-33.
- 8) Chase MH. The digastric reflex in the kitten and adult cat: paradoxical amplitude fluctuations during sleep and wakefulness. *Archives italiennes de biologie* 1970;108:403-22.
- 9) Inoue M, Yamamura K, Nakajima T, Yamada Y. Changes in reflex responses of the masseter and digastric muscles during sleep in freely behaving rabbits. *Neurosci Res* 1999;34:37-44.
- 10) Adachi K, Lee JC, Hu JW, Yao D, Sessle BJ. Motor cortex neuroplasticity associated with lingual nerve injury in rats. *Somatosens Mot Res* 2007;24:97-109.
- 11) Adachi K, Murray GM, Lee JC, Sessle BJ. Noxious lingual stimulation influences the excitability of the face primary motor cerebral cortex (face MI) in the rat. *J Neurophysiol* 2008;100:1234-44.
- 12) Avivi-Arber L, Lee J, Yao D, Adachi K, Sessle B. Neuroplasticity of face sensorimotor cortex and implications for control of orofacial movements. *Japanese Dental Science Review* 2010;46:132-42.
- 13) Komuro A, Morimoto T, Iwata K, Inoue T, Masuda Y, Kato T, et al. Putative feed-forward control of jaw-closing muscle activity during rhythmic jaw movements in the anesthetized rabbit. *J Neurophysiol* 2001;86:2834-44.
- 14) Nozaki S, Iriki A, Nakamura Y. Localization of central rhythm generator involved in cortically induced rhythmical masticatory jaw-opening movement in the guinea pig. *J Neurophysiol* 1986;55:806-25.
- 15) Athanassiadis T, Westberg KG, Olsson KA, Kolta A. Physiological characterization, localization and synaptic inputs of bursting and nonbursting neurons in the trigeminal principal sensory nucleus of the rat. *Eur J Neurosci* 2005;22:3099-110.
- 16) Chandler SH, Goldberg LJ. Differentiation of the neural pathways mediating cortically induced and dopaminergic activation of the central pattern generator (CPG) for rhythmical jaw movements in the anesthetized guinea pig. *Brain Res*

- 1984;323:297-301.
- 17)Massimini M, Ferrarelli F, Huber R, Esser SK, Singh H, Tononi G. Breakdown of cortical effective connectivity during sleep. *Science* 2005;309:2228-32.
- 18)Rekling JC, Funk GD, Bayliss DA, Dong XW, Feldman JL. Synaptic control of motoneuronal excitability. *Physiological reviews* 2000;80:767-852.
- 19)Lee SB, Lee HS, Waterhouse BD. The collateral projection from the dorsal raphe nucleus to whisker-related, trigeminal sensory and facial motor systems in the rat. *Brain Res* 2008;1214:11-22.
- 20)Marani E, Usunoff KG. The trigeminal motonucleus in man. *Archives of physiology and biochemistry* 1998;106:346-54.
- 21)Takada M, Tokuno H, Ikai Y, Mizuno N. Direct projections from the entopeduncular nucleus to the lower brainstem in the rat. *J Comp Neurol* 1994;342:409-29.
- 22)Yasui Y, Itoh K, Mitani A, Takada M, Mizuno N. Cerebral cortical projections to the reticular regions around the trigeminal motor nucleus in the cat. *J Comp Neurol* 1985;241:348-56.
- 23)Katakura N, Chandler SH. Iontophoretic analysis of the pharmacologic mechanisms responsible for initiation and modulation of trigeminal motoneuronal discharge evoked by intra-oral afferent stimulation. *Brain Res* 1991;549:66-77.
- 24)Golbberg LJ, Nakamura Y. Lingually induced inhibition of masseteric motoneurons. *Experientia* 1968;24:371-3.
- 25)Nakamura S, Inoue T, Nakajima K, Moritani M, Nakayama K, Tokita K, et al. Synaptic transmission from the supratrigeminal region to jaw-closing and jaw-opening motoneurons in developing rats. *J Neurophysiol* 2008;100:1885-96.
- 26)Nakamura Y, Goldberg LJ, Mizuno N, Clemente CD. Effects of hypoglossal afferent stimulation on masseteric motoneurons in cats. *Exp Neurol* 1978;61:1-14.
- 27)Rechtschaffen A, Kales A. A manual of standardized terminology, techniques and scoring techniques for sleep stages of human subjects. Los Angeles: Brain Research Institute 1968.
- 28)Bannai M, Kawai N. New therapeutic strategy for amino acid medicine: glycine improves the quality of sleep. *J Pharmacol Sci* 2012;118:145-8.
- 29)Lennartsson B. Muscle spindles in the human anterior digastric muscle. *Acta Odontol Scand* 1979;37:329-33.
- 30)Lennartsson B. Number and distribution of muscle spindles in the masticatory muscles of the rat. *J Anat* 1980;130:279-88.
- 31)Teramoto K, Tsuboi Y, Shinoda M, Hitomi S, Abe K, Kaji K, et al. Changes in expression of growth-associated protein-43 in trigeminal ganglion neurons and of the jaw opening reflex following inferior alveolar nerve transection in rats. *Eur J Oral Sci* 2013;121:86-91.
- 32)Yamada A, Kajii Y, Sakai S, Tsujimura T, Nakamura Y, Ariyasinghe S, et al. Effects of chewing and swallowing behavior on jaw opening reflex responses in freely feeding rabbits. *Neurosci Lett* 2013;535:73-7.
- 33)Belforte JE, Pazo JH. Striatal inhibition of nociceptive responses evoked in trigeminal sensory neurons by tooth pulp stimulation. *J Neurophysiol* 2005;93:1730-41.
- 34)Chiang CY, Dostrovsky JO, Sessle BJ. Periaqueductal gray matter and nucleus raphe magnus involvement in anterior pretectal nucleus-induced inhibition of jaw-opening reflex in rats. *Brain Res* 1991;544:71-8.
- 35)Yajima E, Satoh Y, Ishizuka K, Iwasaki S, Terada K. Suppression of the nociceptive jaw-opening reflex by stimulation of the red nucleus. *Brain Res* 2012;1473:124-30.
- 36)Lund J P, Murry G, Svensson P. Pain and Motor Reflexes. In: Sessle B, J., Lavigne GJ, Lund J P, Dubner R, eds. *Orofacial Pain: From Basic Science to Clinical Management*. 2nd ed: Quintessence Publishing Co, Inc; 2008:109-16.
- 37)Adachi K, Shimizu K, Hu JW, Suzuki I, Sakagami H, Koshikawa N, et al. Purinergic receptors are involved in tooth-pulp evoked nocifensive behavior and brainstem neuronal activity. *Mol Pain* 2010;6:59.
- 38)Lynch JW, Rajendra S, Pierce KD, Handford CA, Barry PH, Schofield PR. Identification of intracellular and extracellular domains mediating signal transduction in the inhibitory glycine receptor chloride channel. *The EMBO journal* 1997;16:110-20.
- 39)Rajendra S, Lynch JW, Schofield PR. The glycine receptor. *Pharmacol Ther* 1997;73:121-46.
- 40)Stradling JR, Davies RJ, Pitson DJ. New approaches to monitoring sleep-related breathing disorders. *Sleep* 1996;19:S77-84.
- 41)Schmitz Y, Castagna C, Mrejeru A, Lizardi-Ortiz JE, Klein Z, Lindsley CW, et al. Glycine Transporter-1 Inhibition Promotes Striatal Axon Sprouting via NMDA Receptors in Dopamine Neurons. *The Journal of Neuroscience* 2013;33:16778-89.

- 42)Johnson JW, Ascher P. Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature* 1987;325:529-31.
- 43)Turman J Jr, Chandler SH. Immunohistochemical evidence for GABA and glycine-containing trigeminal premotoneurons in the guinea pig. *Synapse* 1994;18:7-20.
- 44)Turman JE Jr, Chandler SH. Immunohistochemical localization of glutamate and glutaminase in guinea pig trigeminal premotoneurons. *Brain Res* 1994;634:49-61.
- 45)Sumino R. Central neural pathways involved in the jaw-opening reflex in the cat. In: Dubner R, Kawamura Y, eds. *Oral-Facial Sensory and Motor Mechanisms*. New York: Appleton-Century-crofts 1971:315-22.
- 46)Nonaka M, Nishimura A, Nakamura S, Nakayama K, Mochizuki A, Iijima T, et al. Convergent premotoneuronal inputs to single trigeminal motoneurons. *J Dent Res* 2012;91:888-93.