The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	ALSモデルマウスにおける摂食行動特性の解析
Author(s)	北岡, 好大
Citation	大阪大学, 2023, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/91837
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

学位論文

ALS モデルマウスにおける
摂食行動特性の解析

大阪大学大学院歯学研究科

口腔科学専攻　顎口腔病因病態制御学講座

顎顔面口腔外科学（口腔外科学第一教室）

北岡　好大

緒言

筋萎縮性側索硬化症（Amyotrophic Lateral Sclerosis, ALS）は上位・下位運動ニューロンが障害される進行性の疾患で、10 万人あたり 2 人の発症率であり（Chiò et al., 2013）、運動ニューロンの障害に伴い麻痺が生じて、手足の筋力低下、呼吸困難、摂食・嚥下障害、無数の関連症状を引き起こし、発症後 1 年から 5 年で死に至る（Hillel et al., 1989; Mitchell et al., 2010; Kanning et al., 2010; Traynor et al., 2010）。現在 ALS の治療薬は、症状管理と呼吸補助に基づいており、広く使われている承認薬として興奮性アミノ酸受容体への阻害作用により、神経細胞の保護作用を示すリルゾールと、フリーラジカル消去による脂質過酸化を抑える作用により、神経細胞の酸化的障害を抑制する作用を示すエダラボンがあげられるが、数カ月の延命効果があるのみで、ALS 患者に有効であるとは言えない（Petrov et al., 2017; Sawada et al., 2017）。近年、ウイルスベクターを用いた遺伝子治療を目標とする研究が行われているが（Wang et al., 2022）、ALS の進行を防止する治療薬が未だ開発されておらず、現在根本的な ALS 治療薬が存在しない。嚥下障害は ALS 患者に頻発する症状で、嚥下障害の初期は主に口腔機能障害によって起こるとされており、摂食嚥下障害を改善することで、ALS の予後を改善できる可能

性が報告されている（Kawai et al., 2003; Jani et al., 2016）。そのため ALS の摂食障害を解明し、摂食障害と病状進行との関係性について検討する必要がある。しかしながら ALS の早期診断に有用なバイオマーカーは現在まで開発されておらず、ALS 患者において、病期の初期から終末期までの経時的な観察は困難であることから、これまで ALS の病態進行に関する多くの研究は ALS モデルマウスを用いて行われている。Cu/Zn スーパーオキシドジスムターゼ 1（SOD1）は、家族性 ALS 患者で最も変異が多く認められる遺伝子であり（Rosen et al., 1993; Lutz et al., 2018）、SOD1G93A トランスジェニックマウスは ALS の研究において最も広く使用されているモデルマウスである（Gurney et al., 1994; Lutz et al., 2018）。この ALS モデルマウスは、後肢の攣縮やふらつきなどの症状出現の後、四肢の筋の硬直が進行して約 20 週齢で死に至る（Weydt et al., 2003; Kieran et al., 2004; Wooley et al., 2005; Stam et al., 2008）。また体重の変化が病期の進行によって起こることが確認されており（Smittkamp et al., 2008）、ALS の進行とともに代謝異常が起こり、体重減少の一因となる可能性が報告されている（Kasarskis et al., 1996）。しかし 9 週齢以降の ALS モデルマウスでは、前肢、後肢の握力に変化が認められるものの、終末期においては運動量に影響は認められないといった報告や

（Smittkamp et al., 2008）、13 週齢以降になると、ALS モデルマウスは 1 日の走行距離が急激に減少するという報告があり（Bruestle et al., 2009）、ALS モデルマウスの運動量と体重の関係について明確な見解は得られていないのが現状である。さらに ALS モデルマウスの摂食行動や咀嚼運動と体重の関係についても不明である。そこで本研究では ALS モデルマウスを用いて、咀嚼運動特性や摂食行動特性の解明と、咀嚼運動と体重との関係性について検討を行った。

ALS モデルマウスの摂食行動を記録する方法は数多くあるが（Dell et al., 2014; Egnor et al., 2016; Camomilla et al., 2018）、ビデオ撮影は動物の行動を観察する非侵襲的な手法である（Mackenzie et al., 2020）。咀嚼運動の観察は、これまで下顎骨の任意の点で 3 次元運動軌跡を再構築することによるマウスの顎運動追跡システムなどが用いられてきた（Moriuchi et al., 2019）。また高速度カメラを用い、約 5Hz の高速なマウス顎運動を効率的に記録する報告もあるが（Moriuchi et al., 2019）、いずれの方法も非生理的な条件下では顎の動きを抑制する必要があった。マウスの咀嚼周期は開口期、閉口期、咬合期の 3 期に分類され、マウスにおける特徴的な咀嚼運動については、主に咬筋と側頭筋の協調運動により形成されるが（Utsumi et al., 2010; Moriuchi et al., 2019）、非侵

襲的な方法で咀嚼周期を判定するため、Lever らは、ALS マウスの咀嚼運動をビデオカメラで撮影し、1 秒当たり 30 枚の画像より開閉口を目視にて判定し咀嚼周期について検討を行った（Lever et al., 2009）。本研究ではマウスの咀嚼運動をビデオカメラで撮影し、1 秒あたり 25 枚の画像より開閉口を判定、開口相と閉口相の 2 期に分け、経時的に咀嚼周期を解析し、咀嚼周期の変調について検討を行った。

近年急速に発展している深層学習を含む Artificial Intelligence（AI）は、特徴量の抽出方法をコンピュータが自動的に学習するため、従来よりもはるかに容易に構築可能となった（Mori et al., 2022）。これまで研究者が行っていた実験解析を AI に代用することで、膨大な情報を短時間で解析することが可能になった（Schaefer et al., 2012; Anderson et al., 2014）。医療においても単純 X 線撮影、MRI、超音波画像など、様々な画像解析に AI を適用する試みが多くなされている（Cai et al., 2020）。Single-shot Multibox Detector（SSD）は、画像から物体を検出するための深層学習技術に基づく最先端のアルゴリズムで（Liu et al., 2016）、16 層以上からなる深い畳み込みニューラルネットワーク（CNN）を使用しており、画像認識における AI システムの高性能モデルの一つとして知られている（Krizhevsky et al., 2012; Simonyan et al., 2015; Liu et al.,

2016)。医療において食道がんの検出や、嚥下造影検査の画像から舌骨を検出するシステム、運動中の動物の検出、嚥下評価などに利用されている（Wang et al., 2021; Zhang et al., 2018）。そこで本研究では、ALS モデルマウスの摂食行動を撮影した動画より、摂食行動特性を定量的に評価するとともに咀嚼時の開閉口を自動的に検出する開閉口運動検出 AI モデルを SSD により開発し、咀嚼運動における開閉口運動リズムの変化について詳細な検討を行った。

咀嚼運動は、咀嚼筋、三叉神経運動ニューロン（MoV）、一次感覚ニューロンである三叉神経中脳路核ニューロン（MesV）によって制御されており、近年のマウスやラットを使った研究では、MoV だけでなく MesV も咀嚼リズムの形成に重要な役割を果たすことが報告されている（Komuro et al., 2001）。MesV は閉口筋筋紡錘からの感覚刺激を視床下部に投射し、伸張反射に関連する感覚神経と考えられてきたが、運動に関連する固有感覚情報を他の中枢神経系（CNS）領域へ伝達する役割（Yokoyama et al., 2013; Mameli et al., 2014; Xing et al., 2014）を有しているとの報告がある。MesV は一次感覚ニューロンでありながら唯一脳内に存在し、咀嚼運動を制御する重要な中枢である。新生児期 ALS モデルマウスの MoV における電気生理学的検討では他の運動ニュ

ーロンと同様に過剰発火が報告されているが（Venugopal et al., 2015）、新生児期 ALS モデルマウスの MesV では発火抑制を伴った不規則な発火活動が認められており、Nav1.6 型 Na^+電流の減少が不規則な発火活動の原因であることが報告されている（Seki et al., 2019）。ALS マウスモデルにおけるこれらの神経筋伝達の初期変化は、ALS 関連症状の発症以前より認められていると考えられており（Rocha et al., 2013）、 電気生理学的検討において MoV と MesV で異なった特性変化を認めたことから、これまで ALS の原因であると考えられ、主に研究が行われている運動ニューロンの異常のみならず、これまで注目されることが少なく、ほとんど研究報告がない一次感覚ニューロンの異常についても ALS の病態解明において検討の必要があることが示唆された。しかしながら ALS マウスモデルにおいて、新生児期の MesV で重大な異常が報告されたにもかかわらず、これまで成熟期の MesV における電気生理学的特性についての報告はなく、病態進行後における MesV の解剖学的、電気生理学的異常の有無やその詳細については現在まで不明である。そこで本研究では、成熟期 ALS モデルマウスの咀嚼運動中枢の特性を解明するために、Whole-Cell patch clamp 法を用いて MesV の電気生理学的検討を行った。咀嚼リズムの変調や、咀嚼を制御する一次感覚ニューロンの異

常を解明することは、今後ALS患者における摂食障害の改善につながる可能性がある。さらに一次感覚ニューロンをターゲットとした新たなALS治療薬の開発につながる可能性があると考える。

研究材料と方法

実験動物

本研究では ALS モデルマウス（JAX strain: C57B6SJL-Tg（SOD1G93A）1Gur/J）（mSOD1 マウス）（Jackson Laboratory: Bar Harbor, MA, USA）とその野生型マウス（C57B6J）（WT マウス）を使用した（Seki et al., 2019）。すべての動物プロトコルは、日本学術会議が定める「動物実験の適正な実施のための指針 2006」（指針）に準拠して実施し、大阪大学遺伝子組み換え実験安全委員会（遺伝子組み換え実験安全委員会承認番号：04538）及び大阪大学大学院歯学研究科動物実験委員会（動物実験委員会承認番号 : 動歯-20-005-0）の承認を受けた。本実験では、AI モデル開発を含む摂食行動試験に生後 7〜18 週齢マウス（雄、mSOD1; N=10、WT; N=9）を使用し、Mes V の電気生理学的検討に生後 12 週齢マウス（雄、mSOD1; N=5、WT; N=5）を使用した（表 1）。マウスの遺伝子型は、尾のサンプルを用いた RT-PCR によって決定した。各マウスは温度 23℃、湿度 60%、12 時間毎の明期、暗期に管理された環境で個別のケージ内に飼育し、固形飼料（MF: Oriental Yeast, 東京, 日本）を自由摂取させた（Kida et al., 2015）。

ALS モデルマウスにおける開閉口運動の撮影

飼育用ケージの側壁に小動物用チーズ飼料（カットチーズ: ドギーマンハヤシ, 大阪, 日本）を固定し、2 台の Video Camera（HANDYCAM, model HDR-XR520V: Sony Corporation, 東京, 日本; Everio, model GZ-HM890: 日本ビクター株式会社, 神奈川, 日本）を用いて側方 2 方向（固形飼料よりそれぞれ 115mm と 165mm の位置）から複数回のマウスの摂食行動を観察するため 30 分間ビデオ撮影を行った（1 分あたり 25 枚の画像）（Lever et al., 2009）（図 1A）。事前の摂食制限は行わず自発的な摂食行動を記録した。

マウスの開閉口運動検出 AI モデルの開発

Deep Learning 技術を用いたマウス開閉口運動検出 AI を開発において、本研究では一般物体認識アルゴリズムである Single Shot Multibox Detector（SSD）を用いた（Liu et al., 2016）。開閉口状態の基準については、マウス側貌における開閉口画像より上下顎が垂直方向に最大開口しており、画像上にて側貌の鼻端から下顎下縁における外形線が連続していない状態を ”open”とし（図 1B）、上下顎が咬合し完全閉口しており、

画像上にて側貌の鼻端から下顎下縁における外形線が連続している状態を ”close” と定義した（図 1C）（Lever 2009., et al）。これにより 99%以上の画像を“open”か”close”に分類することが可能であった。開閉口運動検出 AI の開発には、10 匹のマウスより作成した ”open”（ 1504 枚）、“close”（1505 枚）、合計 3009 枚の画像を用いた（図２A）。そのうち、7 匹のマウスより作成した 2036 枚の画像を SSD の訓練に使用し、873 枚の画像を SSD の検証に使用した（図２A）。訓練、検証では使用しなかった 3 匹のマウスより作成した 100 枚の画像を SSD の評価に使用した（図 2A）。経時的に撮影した摂食行動の動画について、開閉口運動検出 AI モデルを用いて” open”、“close” を識別、検出した。検出画面では矩形が事前に設定した情報を含んでいるのかの信頼度を示す確率である Confidence Score (図 3A, B) が算出された。Confidence Score は 1.0 が最高値であり、SSD にて” open”、“close” が適切に検出されたことを確認した。開閉口運動検出 AI モデルの評価に関しては、事前に ”open” と定義した画像 50 枚、”close” と定義した画像 50 枚、合計 100 枚の画像を、開閉口運動検出 AI モデルにより ”open”、“close” の検出を行い、事前の ”open”、“close” との一致率を比較した。”open” と定義された画像が開閉口運動検出 AI モデルにより”open”と検出され、判定が一致する確率

は 88%で、”close” と定義された画像が開閉口運動検出 AI モデルにより ”close” と検出され、判定が一致する確率は 92%であった（図 2B）。 摂食行動を撮影した 30 分間の動画より咀嚼運動を行っている場面を前半 15 分より 1 場面、後半 15 分より 1 場面、合計 2 場面をそれぞれ抽出し SSD により開閉口運動の判定を行った（Lever et al., 2009）。1 秒あたり 25 枚の画像 (1 枚あたり 0.04 秒) より”open”、“close” の判定を行ったところ、マウスの開口に応じて複数個連続した、”open” が判定され、マウスの閉口に応じて複数個連続した “close” が判定された（図 3A）。一連の開閉口運動に対して ”open”、“close” の判定結果はすべて連続しており、全ての画像で ”open” または “close” が判定された。これらの結果から顎運動のパラメータとして「開口相時間」、「閉口相時間」、「開閉口比」を設定し、経時的な計測を行った。「開口相時間」は 1 回の開閉口運動において連続で ”open” と判定された時間で、0.04 秒× (”open” と連続して判定された画像の枚数) とした（図 3B）。「閉口相時間」は 1 回の開閉口運動において連続で ”close” と判定された時間で、0.04 秒× (”close” と連続して判定された画像の枚数) とした（図 3B）。（図 3B）。「開閉口比」は連続する開閉口運動における ”open”、“close” の比とした。それぞれの顎運動のパラメータについて経時的に計測を行った。

ALS モデルマウスの摂食行動観察および体重計測

摂食行動観察において、すべてのマウスは自由摂餌とした。摂食行動観察を行う前に体重計測を行った。ビデオ撮影は 1 週間に 1 度 18 時～22 時に 30 分かけて行った。摂食行動特性の測定項目について、牛村らや木田らが報告されている方法に準じ、「体重」、「摂食開始時間」、「30 分あたりの総摂食時間」、「30 分あたりの総摂食量」の 4 項目を設定した（Ushimura et al., 2015 ; Kida et al., 2015）。「体重」は摂食行動観察前に計測を行った。「摂食開始時間」は観察を開始してから摂食行動開始までに要した時間とした。「30 分あたりの総摂食時間」は観察開始後から 30 分間において観察された摂食行動のうち飼料の咀嚼運動を行っている時間の合計とした。「30 分あたりの総摂食量」は観察開始時における飼料の重量から 30 分後の観察終了時点での飼料の重量を差し引いた変化量とした（Ushimura et al., 2015 ; Kida et al., 2015）。これらの評価項目を 7 週齢から 18 週齢まで毎週測定し、mSOD1 群と WT 群を経時的に比較した。

ALS モデルマウスの MesV に関する電気生理学的検討

実験には生後 12 週齢の WT マウス及び mSOD1 マウスを使用した。これまで報告さ

れている方法に準じて（Del Negro and Chandler, 1997; Wu et al., 2001, 2005; Tanaka et al., 2003, 2006）イソフルランにて深麻酔後、断頭し、冷却した Cutting 用人工脳脊髄液（cutting artificial cerebrospinal fluid; 以下 C-ACSF. 組成; 126 NaCl, 3 KCl, 1.25 NaH_2PO_4,26 $NaHCO_3$, 10 glucose, 1 $CaCl_2$, 5 $MgCl_2$, 4 lactic acid（mM））に浸漬した状態で頭蓋骨を除去し、脳幹組織を摘出した。脳幹ブロックを作製後に、超低融点アガロースゲル（agarose type VII: Sigma-Aldrich, MO, USA）を用いてスライス標本作成装置に固定し、MesV を含む厚さ 300 μm の冠状脳幹スライス標本を作製した。作製したスライス標本を室温（22-24℃）の記録用標準人工脳脊髄液　normal-ACSF（以下 N-ACSF. 組成; 124 NaCl, 3 KCl, 1.25 NaH_2PO_4,26 $NaHCO_3$, 10 glucose, 2 $CaCl_2$, 2 $MgCl_2$（mM））に移し、40-50 分静置した後、記録に用いた。すべての細胞外液は、95 %O_2+5%CO_2 混合ガスにて混和させた状態で使用した。

正立型 Nomarski 赤外線微分干渉顕微鏡（BX51W1: オリンパス, 東京, 日本）のステージ上に設置した記録用チャンバー（アクリル製、容量 2.0ml）に脳幹スライス標本を静置し、スライスアンカー（Warner Instruments: Holliston, MA, USA）を用いて固定した。N-ACSF を 2 ml/min の速度で潅流しながら赤外線透視条件下で直径約 20-40 μm

の偽単極性の類円形細胞である MesV を解剖学的に同定し、ギガシール形成後 Whole-cell 記録を行った。記録用電極は、微小ガラス管電極作成装置（P-87: Sutter Instruments, Novato, CA, USA）を用いて、外径 1.5 mm、内径 1.12 mm のボロシリケート製ガラス管（150 EA/PKG, インターメディカル: 東京, 日本）を先端抵抗値が 3-5 MΩ となるように作成した。電極内液はカリウム塩を主成分とするものを用い、組成は 115K-gluconate, 25 KCl, 9 NaCl, 10 HEPES, 0.2 EGTA, 1 $MgCl_2$, 3 K_2-ATP, 1 Na-GTP（mM）とし、pH 7.25 に調整した。ニューロン表層と電極間で形成されるアクセス抵抗値は 15 MΩ 未満のニューロンのみを記録対象とし、Voltage-clamp（v-clamp）あるいは Current-clamp（c-clamp）条件下で MesV の電気活動を記録した。電気信号は、patch clamp 用増幅器（Multiclamp 700B: Molecular Devices, San Jose, CA, USA）で増幅後にアナログ-デジタル変換器（Digidata 1550 A: Molecular Devices, San Jose, CA, USA）でデジタル変換し、パーソナルコンピューターと専用ソフトウェア（CLAMPEX 10.6: Molecular Devices, San Jose, CA, USA）を用いて記録及び解析を行った。

統計処理

統計解析は Excel statistics program（SPSS Inc: Chicago, IL, USA）を用いて行った。正規性については Kolmogorov-Sminov 検定または Shapiro-Wilk 検定、分散の等質性については Levene の検定を用いた。独立したサブセットは student-*t* 検定で分析した。すべてのデータは平均値 ± 標準誤差（S.E.）で表した。開閉口相時間、体重、総摂食時間、総摂食量、摂食開始時間、において、WT 群、mSOD1 群間の比較は二元配置反復測定 ANOVA で評価した。両群間に交互作用が検出された場合は、student-*t* 検定にて、post-hoc 比較を行った。開閉口相時間と体重との関係は、ピアソンの積率相関係数検定を用いて評価した。有意水準は 5%とした。

結果

マウス開閉口運動検出 AI モデルによる開閉口運動の判定

開閉口運動検出 AI モデルにより開閉口運動が検出され、判定結果より開口相時間、閉口相時間、開閉口比を計測し、7 週齢から 18 週齢の各週齢において WT 群と mSOD1 群を比較した。mSOD1 群において 12 週齢以降、開口相時間は延長し、17 週齢以降、有意な延長を認めた（$F(1, 146) = 1.95$, $p = 0.01$, 17week; WT, 0.05 ± 0.01 s, mSOD1, 0.08 ± 0.01 s, $p = 0.01$, 18week; WT, 0.05 ± 0.01 s, mSOD1, 0.09 ± 0.01 s, $p = 0.01$, repeated-measured ANOVA followed by student-*t* post hoc comparison, 図 4A）。7 週齢から 18 週齢の閉口相時間（$F(1, 182) = 1.04$, $p = 0.99$, repeated-measured ANOVA, 図 4B）、開閉口比（$F(1, 263) = 1.09$, $p = 0.12$, repeated-measured ANOVA, 図 4C）については両群に有意な差を認めなかった。

ALS モデルマウスの体重および摂食行動の各パラメータにおける経時的変化

7 週齢の体重を 1 とした体重（Normalized weight）について WT 群は、7 週齢から 12 週齢にかけて増加傾向を認めたが、mSOD1 群は 12 週齢以降に減少を認め、15 週、17

週、18 週において有意に減少した（F（1, 218）= 0.88, p = 0.01, 15week; WT, 1.23 ± 0.03, mSOD1, 1.14 ± 0.04, p = 0.01, 17week; WT, 1.25 ± 0.05, mSOD1, 1.08 ± 0.05, p = 0.01, 18week; WT, 1.31 ± 0.04, mSOD1, 1.05 ± 0.05, p = 0.01, repeated-measured ANOVA followed by student-*t* post hoc comparison, 図 5A）。摂食開始時間において両群ともに減少傾向であったが両群間に有意差は認められなかった（F（1, 164）= 1.09, p = 0.56 8week; WT, 323.50 ± 84.31 s, mSOD1, 426.50 ± 294.50 s, 18week; WT, 58.83 ± 17.60 s, mSOD1, 56.00 ± 8.00 s, repeated-measured ANOVA followed by student-*t* post hoc comparison, 図 5B）。30 分あたりの総摂食時間については WT 群では 7 週齢から 18 週齢において変化は認められなかったが、mSOD1 群では延長傾向を認めた（F（1,163）= 0.79, p = 0.99, 17week; WT, 180.80 ± 32.03 s, mSOD1, 303.14 ± 39.48, 18week; WT, 89.00 ± 19.49 s, mSOD1, 417.50 ± 151.67 s, repeated-measured ANOVA followed by student-*t* post hoc comparison, 図 5C）。30 分間の総摂食量に関しては両群ともに増加傾向であったが両群間に有意差は認められなかった（F（1, 169）= 1.20, p = 0.23 7week; WT, 0.08 ± 0.02 g, mSOD1, 0.02 ± 0.01 g, 18week; WT, 0.16 ± 0.03 s, mSOD1, 0.27 ± 0.09, repeated-measured ANOVA followed by student-*t* post hoc comparison, 図 5D）。

12 週齢以降における ALS モデルマウスの体重変化と開閉口相の関係

体重減少に関連する因子を検討するため、開口相時間、閉口相時間および開閉口比において、12 週齢以降認められた体重減少との相関関係について検討をおこなった。Normalized weight と開口相時間において、WT 群では相関は認められなかったが （r = 0.08, p = 0.57, 図 6A）、mSOD1 群では負の相関が認められた（r = -0.44, p = 0.01, 図 6B）。Normalized weight と閉口相時間において、WT 群、mSOD1 群ともに相関は認められなかった（WT; r = 0.22, p = 0.19, mSOD1; r = -0.07, p = 0.67, 図 6C）。Normalized weight と開閉口比において、WT 群、mSOD1 群ともに相関は認められなかった（WT; r = 0.13, p = 0.41, mSOD1; r = 0.06, p = 0.70, 図 6D）。

12 週齢 ALS モデルマウスにおける MesV の電気生理学的特性変化

12 週齢のマウスを用いて、MesV の電気生理学的特性を比較した（図 7A）。基本膜特性において v-clamp 条件下では、mSOD1 群の静止膜電位（RMP）は WT 群に比べ有意に低かった（F（1, 23）= 0.39, WT: -52.50 ± 4.50 mV、mSOD1; -84.80 ± 5.70 mV、p = 0.01, student-t）。その他の基本的な膜特性には、有意な差は認められなかった（表 2）。矩形

波脱分極パルスを与えると c-clamp 条件下では、単一の活動電位を示す MesV と連続発火活動を示す MesV に分かれる（図 7A）。mSOD1 群では連続発火活動を示す MesV の比率が減少傾向を示した（WT; 56%, 5/9, mSOD1; 20%, 3/15, p = 0.07 Pearson's chi-square test, 図 7B）。c-clamp 下で 10 pA、10 ms の矩形波脱分極パルスにより活動電位（AP）が誘発される（図 8A）。mSOD1 群と WT 群の AP 特性（Spike height、Half width、Slope、AHP、Duration）に有意な差は認められなかった。（図 8B、表 3）。c-clamp 下で 0〜1000 pA、500 ms の矩形波過分極パルスを加えると、連続発火活動が誘発される（図 9A）。連続発火活動を示す Mes V において mSOD1 群では、WT 群に比べ発火時間が有意に短縮した（F（1, 6）= 39.69, WT; -55.50 ± 4.50 ms, mSOD1; -23.80 ± 5.70 ms, p = 0.01, student-*t,* 図 9B）。周波数-電流曲線（F-I 曲線）において、mSOD1 群は有意な周波数の上昇を認めた （F（1, 48）= 3.85, p = 0.01, 700 pA; WT, 124.80 ± 12.10 Hz, mSOD1; 157.90 ± 12.80 Hz, p = 0.02, 800 pA; WT, 129.30 ± 12.40 Hz, mSOD1, 174.10 ± 13.50 Hz, p = 0.01, 900 pA; WT, 136.90 ± 11.10 Hz, mSOD1, 184.30 ± 21.70 Hz, p = 0.03, 1000 pA; WT, 143.10 ± 9.60 Hz, mSOD1, 194.03 ± 18.70 Hz, p = 0.02, repeated-measured ANOVA followed by student-*t* post hoc comparison, 図 9C）。

考察

本研究において、ALS モデルマウスでは同時期に、咀嚼リズムの変調と体重減少が認められた。成熟期 ALS モデルマウスにおける MesV の電気生理学的検討を行ったところ、発火ニューロンの割合が減少し、発火活動の変調が認められた。本研究より ALS モデルマウスにおいて、新生児期 ALS モデルマウスで報告された MesV の特性変化が、成熟期 ALS モデルマウスでも生じていることが新たに示された。

AI を用いた ALS モデルマウスの咀嚼運動解析

本研究において、マウスの摂食行動をビデオカメラで記録することで、非侵襲的に咀嚼運動を測定することが可能となった。さらに開閉口を自動的に検出する開閉口運動検出 AI モデルを開発したことで、多量の画像データを処理することが可能になった。開閉口運動検出 AI の判定と研究者が設定したマウスの開口、閉口判定の一致率はそれぞれ 88%と 92%で、高い一致率を示した。さらに、本研究の開閉口運動検出 AI モデルより計測した ALS モデルマウスの開口相時間は 0.06～0.12 秒、閉口相時間は 0.06～0.08 秒であったが、Lever らや吉田らの報告によるとマウスの開閉口運動サイク

ルは約 5Hz で本研究での結果と近似しており（Lever et al.,2009；Yoshida et al.,2021）、ビデオカメラにてマウスの摂食行動を記録し、開閉口運動検出 AI モデルにて咀嚼リズムを解析する本研究方法は妥当であると考える。しかしながら AI モデルにはいくつかの限界がある。まず、開閉口の学習に用いた画像は、研究者の目視によって選択されるため、研究者間の判定基準の相違により開口閉口の判断結果にばらつきが生じる可能性がある。そこで本研究では研究者 2 人によって選択された完全開口と完全閉口の画像を AI モデルの学習に使用し、可能な限り結果にばらつきが生じないよう配慮した。そのために用いた画像の数がやや少なく、どのような画像を苦手とするかというモデルの特性は明らかとなっていない。高精度の CNN を構築するために多量のデータセットを蓄積しても精度の向上が見込めない可能性があり、今後の AI モデルを使った研究においてデータセットの選択はモデルの性能向上の必要性に応じて詳細に検討する必要がある（Mackenzie et al., 2020）。

本研究で開発したマウスの開閉口運動検出 AI モデルは、今後ヒトの開閉口運動検出 AI モデルの作成に応用可能である。ヒトの咀嚼運動検出 AI は非侵襲的に咀嚼リズムの変調をリアルタイムで検出でき、在宅医療においても使用可能であることから、今

後 ALS 患者の病状進行を判定する重要なバイオマーカーとなる可能性がある。

ALS モデルマウスにおける咀嚼運動の変調と体重との関係

本研究において 12 週齢以降の ALS モデルマウスにおいて体重減少を認めた。総摂食量が ALS モデルマウスの週齢に比例して増加しており、野生型マウスとの有意差を認めなかったことから、体重減少の原因として過去に報告された ALS の病状進行にともなった代謝異常が ALS モデルマウスに生じていることが推測された（Kasarskis et al., 1996）。ALS モデルマウスの運動量と体重の関係については明確な見解は得られていないのが現状であるが（Smittkamp et al., 2008 ; Bruestle et al., 2009）、本研究において ALS モデルマウスの摂食開始時間は週齢と反比例して減少傾向であり、野生型マウスと比較し有意差を認めなかったことから、明確な運動量の減少は疑われなかった。さらに咀嚼運動と体重減少の関係について、咀嚼運動は食物の摂取と消化に大きな役割を果たし、様々な機序で体重に影響を与えると考えられており（James et al., 2018）、ヒトを対象とした過去の研究では食物の咀嚼回数を 15 回から 40 回に増加させたところ、食物摂取量の減少、満腹感の増加が認められ、長時間の咀嚼運動が摂食速度の減少を

通じて体重減少に影響を与える可能性が報告されている（Hollis et al., 2018）。本研究において、咀嚼リズムの変調及び体重減少が認められた 12 週齢 ALS モデルマウスでは平均 167.3 秒、18 週齢においては平均 417.5 秒と摂食時間が延長しており、咀嚼時間の延長が摂食速度の減少を通じて体重減少の一因となった可能性があると考える。咀嚼時間の延長の原因について、12 週齢以降の ALS モデルマウスでは週齢に従って開口相時間の延長は認めたものの、閉口相時間の延長は認めなかったことから、MesV や MoV を含めた閉口筋筋活動のメカニズムに変化が生じている可能性が推察された。今後、咀嚼運動特性や摂食行動特性の変化が、ALS で認められる様々な臨床症状と関係があるのか検討を行う必要がある。

成熟期 ALS モデルマウスにおける Mes V の特性変化

本研究では、成熟期 ALS モデルマウスの MesV において、基本膜特性のうち静止膜電位の顕著な低下が観察された。MesV の静止膜電位の安定化や細胞の興奮性の調節には、緩徐な内向き整流電（I(h)）が関与していることが報告されている（Tanaka et al., 2002）。また、Nav1.6 型 Na^+電流の一つである持続性ナトリウム電流（I(NaP)）を調節

することにより、MesV の膜興奮性や放電特性が大きく変化することが示されている（Tanaka et al., 2006）。さらに I（NaP）は緩徐に不活性化されることが多く、一過性の活動電位の発生には直接関与しておらず（Venugopal et al., 2019）、スパイク発生の閾値直下の電圧領域における膜興奮性の制御に関連している（Wu et al., 2002）。これらのことから本研究における発火ニューロンの割合の減少は、I（NaP）の減少に関連している可能性がある。乳幼児期の MesV では膜電位の持続的な脱分極条件下で誘発される内因性バースト発火活動が認められるが（Tanaka et al., 2003; Wu et al., 2005; Venugopal et al., 2019）、本研究において成熟期の MesV では、乳幼児期マウスの MesV で認められた連続発火活動は認められたものの、内因性バースト発火活動は認められなかった。発火ニューロンにおける比較では、成熟期 ALS モデルマウスの MesV において、スパイク周波数の大幅な上昇と発火時間の減少を示した。これまでの報告では、ナトリウム電流の他に、一過性外向き電流（I（TOC））や 4-AP 感受性持続性外向き電流（I（4-AP））が MesV の発火活動の持続時間に関与しており（Del Negro et al., 1997）、特に I（4-AP）は、ニューロンが持続的な発火を示すか、脱分極電流に反応して順応するのかを決定する（Del Negro et al., 1997）。この電流の神経伝達物質による調節や静

止膜電位の調節は MesV の出力特性を変化させる可能性があり、ナトリウム電流の増強とカリウム電流の減少の両方が過剰興奮を引き起こすことが報告されている（Brian et al., 2014）。このことから、成熟期 ALS モデルマウスの MesV においては、I（NaP）に代表されるナトリウムコンダクタンスのみならず、I（TOC）や I（4-AP）などのカリウムコンダクタンス、I（h）などが変調をきたしている可能性がある。ALS モデルマウスおいて、運動ニューロンだけでなく一次感覚ニューロンである MesV の膜興奮性が、ナトリウムコンダクタンスやカリウムコンダクタンスなどの複数のイオンチャネルの変調を伴って進行性に変化した可能性が示された。本研究においては c-clamp 条件下のみでの検討であったが、過去の研究における膜興奮性の解析については v-clamp 条件下に各種電流の関与に対しての検討がなされている。MesV の膜興奮性や放電特性について v-clamp 条件下での更なる検討を行うことが今後の課題である。

これまで ALS は運動ニューロンの異常が原因であると考えられてきたが、成熟期 ALS モデルマウスにおいて一次感覚ニューロンの特性異常が認められたことから、本研究結果は ALS 患者における摂食障害の解明の一助となるだけでなく、一次感覚ニューロンをターゲットとした新たな ALS 治療薬の開発につながる可能性がある。

結語

本研究では、ALS モデルマウスにおける摂食行動特性に関する行動生理学的検討及び三叉神経中脳路核ニューロンの電気生理学的検討を行った。ALS モデルマウスの咀嚼運動の変調と体重減少は同時期より認められた。ALS モデルマウスの体重減少の原因について、総摂食量の減少は認めず摂食時間の延長を認めたことから、ALS の病状進行に伴った代謝異常とともに、咀嚼運動の変調を伴った摂食時間の延長が一因となった可能性が示唆された。ALS モデルマウスの三叉神経中脳路核ニューロンにおいて、これまで乳幼児期で報告されていた特性変化が成熟期でも認められた。特性変化の原因について、乳幼児期 ALS モデルマウスで報告されているナトリウムコンダクタンスのみでなくカリウムコンダクタンスなど複数のイオンチャネルが変調をきたしている可能性が示唆された。本研究結果より ALS における摂食障害と病状進行との関係性について一部解明が行われた。今後 ALS における摂食障害についてさらなる解明を行い、ALS 患者における摂食障害の治療を目指す。

謝辞

稿を終えるにあたり、本研究を行う機会を与えて頂き、終始御懇切なる御指導、御鞭撻を賜りました大阪大学歯学研究科顎口腔病因病態制御学講座（口腔外科学第一教室）教授 田中晋先生に深甚なる謝意を表します。また、本研究の立案ならびに進行にあたり、終始御教示、御指導頂きました、大阪大学歯学研究科顎口腔病因病態制御学講座（口腔外科学第一教室）助教　関壮樹先生に深甚なる謝意を表します。最後に本研究の円滑な進展のため、特別な御配慮を頂きました、大阪大学歯学研究科顎口腔病因病態制御学講座（口腔外科学第一教室）の教室員諸兄に深く御礼申し上げます。

引用文献

A.I. Dell, J.A. Bender, K. Branson, I.D. Couzin, G.G. de Polavieja, L.P.J.J. Noldus, A. Pérez-Escudero, P. Perona, A.D. Straw, M. Wikelski, Ulrich Brose. Automated image-based tracking and its application in ecology. *Trends Ecol Evol,* 2014, 29, 7, 417-428

Boehmer G, Greffrath W, Martin E, and Hermann S. Subthreshold oscillation of the membrane potential in magnocellular neurones of the rat supraoptic nucleus. *J Physiol.* 2000. 526, 115–128.

Bruestle DA, Cutler RG, Telljohann RS, Mattson MP. Decline in daily running distance presages disease onset in a mouse model of ALS. *Neuromolecular Med.* 2009, 11, 2, 58-62.

Cathleen Lutz, Mouse models of ALS: Past, present and future, *Brain Research*, 2018, 1693, 1-10.

Chiò A, Logroscino G, Hardiman O, Swingler R, Mitchell D, Beghi E, Traynor BG; Eurals Consortium. Prognostic factors in ALS: a critical review. *Amyotroph Lateral Scler.* 2009, 10, 310–323.

Cai L, Gao J, Zhao D. A review of the application of deep learning in medical image classification and segmentation. *Ann Transl Med*. 2020, 8, 11, 713

Del Negro CA, Chandler SH. Physiological and theoretical analysis of K+ currents controlling discharge in neonatal rat mesencephalic trigeminal neurons. *J Neurophysiol.* 1997, 77, 2, 537-53.

D.J. Anderson, P. Perona. Toward a science of computational ethology. *Neuron*, 2014, 84, 1, 18-31

Geirhos R, Rubisch P, Michaelis C, Bethge M, Wichmann F. A, and Brendel W. ImageNet-trained CNNs are biased towards texture; increasing shape bias improves accuracy and robustness. *International Conference on Learning Representations*（*ICLR*）, 2019

Gurney ME, Pu H, Chiu AY, Dal Canto MC, Polchow CY, Alexander DD, Caliendo J, Hentati A, Kwon YW, Deng HX, et al. Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu, Zn superoxide dismutase mutation. *Science,* 1994, 264, 5166, 1772-1775

Hillel AD, Miller R. Bulbar amyotrophic lateral sclerosis: patterns of progression and clinical management. *Head Neck*. 1989, 11, 1, 51-9.

Hollis JH. The effect of mastication on food intake, satiety and body weight. *Physiol Behav.* 2018, 193, Pt B, 242-245.

Jani, Mansi Pankaj and Gore, Geeta Bharat. 'Swallowing Characteristics in Amyotrophic Lateral Sclerosis' *NeuroRehabilitation.* 2016, 39, 2 273 – 276.

Kasarskis, E. J., and H. E. Neville. Management of ALS: Nutritional Care. *Neurology,* 1996, 47, 4, 118–20.

Kawai S, Tsukuda M, Mochimatsu I, Enomoto H, Kagesato Y, Hirose H, Kuroiwa Y, Suzuki Y. A Study of the Early Stage of Dysphagia in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Dysphagia,* 2003, 18, 1–8.

Kieran, D., Kalmar, B., Dick, J. R., Riddoch-Contreras, J., Burnstock, G., & Greensmith, L. Treatment with arimoclomol, a coinducer of heat shock proteins, delays disease progression in ALS mice. *Nature Medicine*, 2004, 10, 402–405.

Komuro A, Morimoto T, Iwata K, Inoue T, Masuda Y, Kato T, Hidaka O. Putative feed-forward control of jaw-closing muscle activity during rhythmic jaw movements in the anesthetized rabbit. *J Neurophysiol*. 2001, 86, 6, 2834-44.

Krizhevsky, A.; Sutskever, I.; Hinton, G.E. ImageNet Classification with Deep Convolutional Neural Networks. *Adv. Neural Inf. Process. Syst.* 2012, 25, 1097–1105.

Lever, T.E., Gorsek, A., Cox, K.T. et al. An Animal Model of Oral Dysphagia in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Dysphagia,* 2009 24, 180–195.

Liu, Wei, Dragomir Anguelov, Dumitru Erhan, Christian Szegedy, Scott Reed, Cheng-Yang Fu, and Alexander C. Berg. SSD: Single Shot MultiBox Detector. *In Computer Vision – ECCV 2016*, 2016. 21–37.

Luo PF, Wang BR, Peng ZZ, Li JS: Morphological characteristics and terminating patterns of masseteric neurons of the mesencephalic trigeminal nucleus in the rat: an intracellular horseradish peroxidase labeling study. *J Comp Neurol.* 1991, 303, 286-299.

Mackenzie Weygandt Mathis, Alexander Mathis, Deep learning tools for the measurement of animal behavior in neuroscience, *Current Opinion in Neurobiology.* 2020, 60, 1-11,

Mameli O, Stanzani S, Russo A, Pellitteri R, Manca P, De Riu PL, Caria MA: Involvement of trigeminal mesencephalic nucleus in kinetic encoding of whisker movements. *Brain Res Bull.* 2014, 102, 37-45.

McCombe, P.A.; Wray, N.R.; Henderson, R.D. Extra-motor abnormalities in amyotrophic lateral sclerosis: Another layer of heterogeneity. *Expert Rev. Neurother.* 2017, 17, 561–577

Mitchell JD, Callagher P, Gardham J, Mitchell C, Dixon M, Addison-Jones R, Bennett W, O'Brien MR. Timelines in the diagnostic evaluation of people with suspected amyotrophic lateral sclerosis（ALS）/motor neuron disease（MND）–a 20-year review: can we do better? *Amyotroph Lateral Scler*, 2010,11,6, 537-541

Moriuchi, Emi, Ryo Hamanaka, Yoshiyuki Koga, Ayumi Fujishita, Tomoko Yoshimi, Go Yasuda, Haruka Kohara, and Noriaki Yoshida. Development and evaluation of a jaw-tracking system for mice: reconstruction of three-dimensional movement trajectories on an arbitrary point on the mandible. *BioMed Eng OnLine.* 2019, 18, 1, 59.

Mori Y, Oichi T, Enomoto-Iwamoto M, Saito T. Automatic Detection of Medial and Lateral Compartments from Histological Sections of Mouse Knee Joints Using the Single-Shot Multibox Detector Algorithm. *CARTILAGE*. 2022, 13,1.

Petrov, D., Mansfield, C., Moussy, A., and Hermine, O. ALS clinical trials review: 20 years of failure. are we any closer to registering a new treatment? *Front. Aging Neurosci.* 2017, 9, 68.

R. Egnor, K. Branson. Computational analysis of behavior. *Annu Rev Neurosci*, 2019, 39, 217-236

Rocha MC, Pousinha PA, Correia AM, Sebastião AM, Ribeiro JA. Early changes of neuromuscular transmission in the SOD1（G93A） mice model of ALS start long before motor symptoms onset. *PLoS One*. 2013, 8, 9, e73846.

Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, O'Regan JP, Deng HX, et al. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*, 1993, 362, 6415, 59-62

Sawada, H. Clinical efficacy of edaravone for the treatment of amyotrophic lateral sclerosis. *Expert Opin. Pharmacother*. 2017, 18, 735–738.

Schaefer AT, Claridge-Chang A. The surveillance state of behavioral automation. *Curr Opin Neurobiol*. 2012, 22, 1, 170-6.

Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. National Institutes of Health image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods.* 2012, 9, 671–675.

Seki S, Yamamoto T, Quinn K, Spigelman I, Pantazis A, Olcese R, Wiedau-Pazos M, Chandler SH, Venugopal S. Circuit-Specific Early Impairment of Proprioceptive Sensory Neurons in the SOD1G93A Mouse Model for ALS. *J Neurosci.* 2019, 30, 39, 44, 8798-8815.

S.E. Smittkamp, J.W. Brown, J.A. Stanford, Time-course and characterization of orolingual motor deficits in B6SJL-Tg（SOD1-G93A）1Gur/J mice, *Neuroscience,* 151, 2, 2008, 613-621,

Simonyan K, Zisserman A. Very deep convolutional networks for large-scale image recognition. *ICLR 2015*. 2015,1409.1556.

S. Saxena, F. Roselli, K. Singh, K. Leptien, J.P. Julien, F. Gros-Louis, P. Caroni. Neuroprotection through excitability and mTOR required in ALS motoneurons to delay disease and extend survival. *Neuron*, 2013, 80, 80-96

Stam, N. C., Nithianantharajah, J., Howard, M. L., Atkin, J. D., Cheema, S. S., & Hannan, A. J.. Sex-specific behavioural effects of environmental enrichment in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *European Journal of Neuroscience*. 2008, 28, 717–723.

Tanaka S, Chandler SH. Serotonergic modulation of persistent sodium currents and membrane excitability via cyclic AMP-protein kinase A cascade in mesencephalic V neurons. *J Neurosci Res*. 2006, 15,83,7, 1362-72.

Tanaka S, Wu N, Hsaio CF, Turman J Jr, Chandler SH. Development of inward rectification and control of membrane excitability in mesencephalic v neurons. *J Neurophysiol.* 2003, 89, 3, 1288-98.

Tao, Q.Q.; Wei, Q.; Wu, Z.Y. Sensory nerve disturbance in amyotrophic lateral sclerosis. *Life Sci*. 2018, 203, 242–245.

Traynor, B. J., Codd, M. B., Corr, B., Forde, C., Frost, E., & Hardiman, O. M. Clinical features of amyotrophic lateral sclerosis according to the El Escorial and Airlie House diagnostic criteria: A population-based study. *Archives of Neurology*, 2000, 57, 1171–1176.

Ushimura A, Tsuji T, Tanaka S, Kogo M, Yamamoto T. Neuropeptide-Y modulates eating patterns and masticatory muscle activity in rats. *Behav Brain Res.* 2015 ,278, 520-6.

Utsumi D, Nakamura A, Matsuo K, Zeredo JL, Koga Y, Yoshida N. Motor coordination of masseter and temporalis muscle during mastication in mice. *Int J Stomatol Occlusion Med.* 2010, 3, 187–94.

V. Camomilla, E. Bergamini, S. Fantozzi, G. Vannozzi. Trends supporting the in-field use of wearable inertial sensors for sport performance evaluation: a systematic review. *Sensors*, 2018, 18, 3. 873

Venugopal S, Hsiao CF, Sonoda T, Wiedau-Pazos M, Chandler SH. Homeostatic dysregulation in membrane properties of masticatory motoneurons compared with oculomotor neurons in a mouse model for amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci.* 2015, 35, 2, 707-20.

Venugopal S, Seki S, Terman DH, Pantazis A, Olcese R, Wiedau-Pazos M, Chandler SH. Resurgent Na+ Current Offers Noise Modulation in Bursting Neurons. *PLoS Comput Biol.* 2019, 15, 6, 1007154.

Wang S, Ichinomiya T, Savchenko P, Wang D, Sawada A, Li X, Duong T, Li W, Bonds JA, Kim EJ, Miyanohara A, Roth DM, Patel HH, Patel PM, Tadokoro T, Marsala M, Head BP. Subpial delivery of adeno-associated virus 9-synapsin-caveolin-1（AAV9-SynCav1）preserves motor neuron and neuromuscular junction morphology, motor function, delays disease onset, and extends survival in hSOD1G93A mice. *Theranostics*. 2022, 12 ,12 ,5389-5403

Wainger BJ, Kiskinis E, Mellin C, Wiskow O, Han SS, Sandoe J, Perez NP, Williams LA, Lee S, Boulting G, Berry JD, Brown RH Jr, Cudkowicz ME, Bean BP, Eggan K, Woolf CJ.Intrinsic Membrane Hyperexcitability of Amyotrophic Lateral Sclerosis Patient-Derived Motor Neurons, *Cell Reports*, 2014, 7, 1, 1-11,

Wang YK, Syu HY, Chen YH, Chung CS, Tseng YS, Ho SY, Huang CW, Wu IC, Wang HC. Endoscopic Images by a Single-Shot Multibox Detector for the Identification of Early Cancerous Lesions in the Esophagus: A Pilot Study. *Cancers* 2021, 13, 321.

Wendy W. Yang, Richard L. Sidman, Tatyana V. Taksir, Christopher M. Treleaven, Jonathan A. Fidler, Seng H. Cheng, James C. Dodge, Lamya S. Shihabuddin, Relationship between neuropathology and disease progression in the SOD1G93A ALS mouse, *Experimental Neurology*, 2011, 227, 2, 287-295,

Weydt, P., Hong, S. Y., Kliot, M., & Möller, T. Assessing disease onset and progression in the SOD1 mouse model of ALS. *NeuroReport*, 2003, 14, 1051–1054.

Wooley, C. M., Sher, R. B., Kale, A., Frankel, W. N., Cox, G. A., & Seburn, K. L. Gait analysis detects early changes in transgenic SOD1（G93A） mice. *Muscle and Nerve*, 2005, 32, 43–50.

Wu N, Enomoto A, Tanaka S, Hsiao CF, Nykamp DQ, Izhikevich E, Chandler SH. Persistent sodium currents in mesencephalic v neurons participate in burst generation and control of membrane excitability. *J Neurophysiol.* 2005, 93, 5, 2710-22.

Xing J, -L, Hu S, -J, Yang J. Electrophysiological Features of Neurons in the Mesencephalic Trigeminal Nuclei. *Neurosignals* 2014, 22, 79-91.

Yokoyama S, Kinoshita K, Muroi Y, Ishii T. The effects of bilateral lesions of the mesencephalic trigeminal sensory nucleus on nocturnal feeding and related behaviors in mice. *Life Sci,* 2013, 93, 681-686.

Yoshida S, Oka H. Membrane properties of dissociated trigeminal mesencephalic neurons of the adult rat. *Neurosci Res,* 1998, 30, 227-234.

Yasuda, G., Moriuchi, E., Hamanaka, R. et al. Visualization of mandibular movement relative to the maxilla during mastication in mice: integration of kinematic analysis and reconstruction of a three-dimensional model of the maxillofacial structure. *BMC Oral Health,* 2022, 21, 527.

Zhang, Z., Coyle, J.L. & Sejdić, E. Automatic hyoid bone detection in fluoroscopic images using deep learning. *Sci Rep,* 2018, 8, 12310.

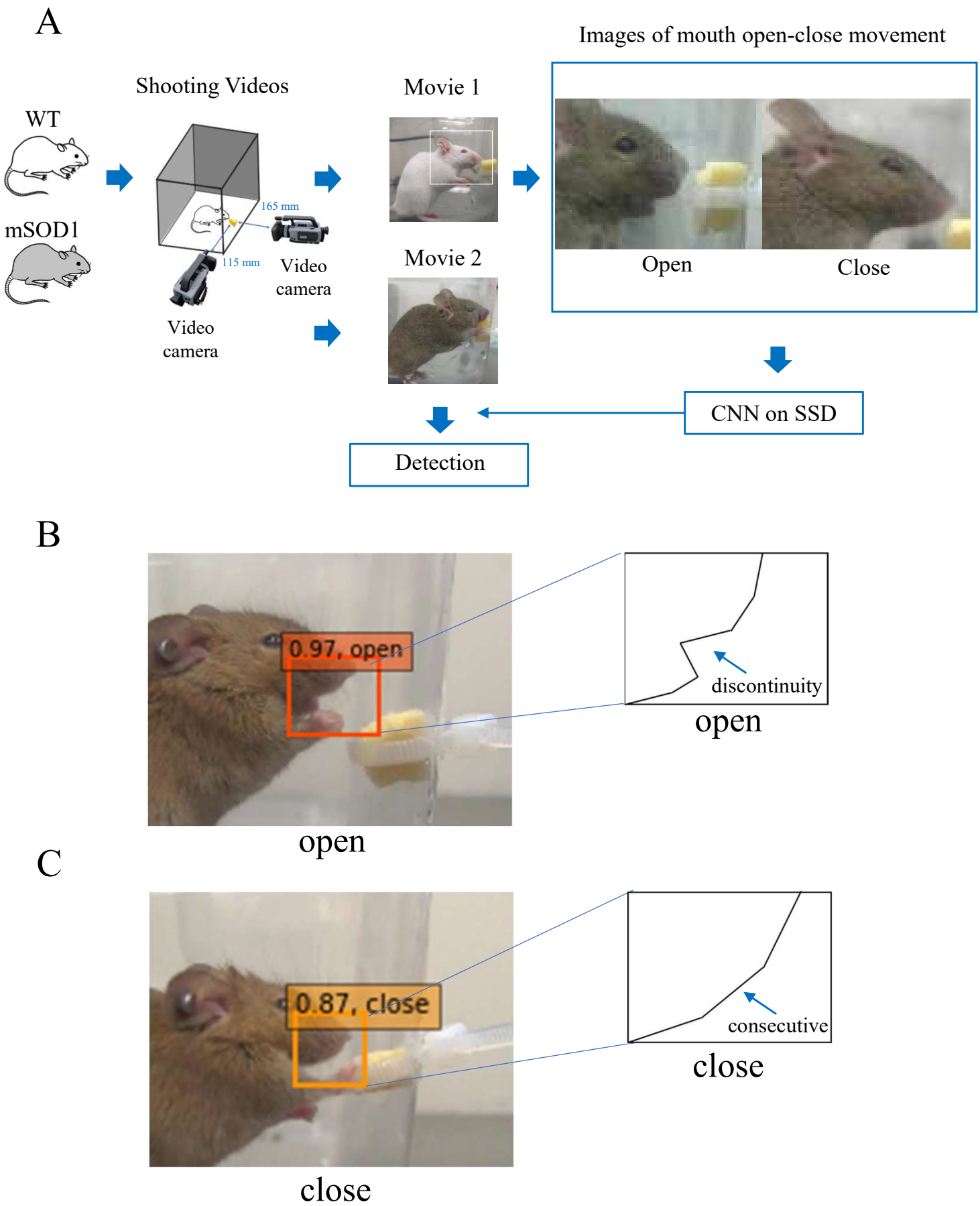
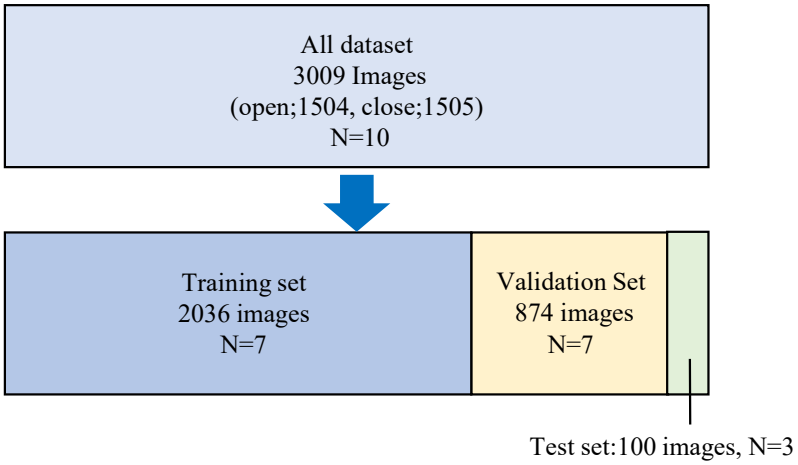


図1:　マウス開閉口運動検出 AI の構築

(A) 摂食行動を2台のビデオカメラで左右2方向から30分間撮影した。撮影された動画より、マウス開閉口画像を作成し、Single shot maltibox detector (SSD) に学習させた。(B) マウス開口の検出。画像上にて側貌の鼻端から下顎下縁における外形線が連続していない状態は” open”と判定された。(C) マウス閉口の検出。画像上にて側貌の鼻端から下顎下縁における外形線が連続している状態は ”close” と判定された。

A



B

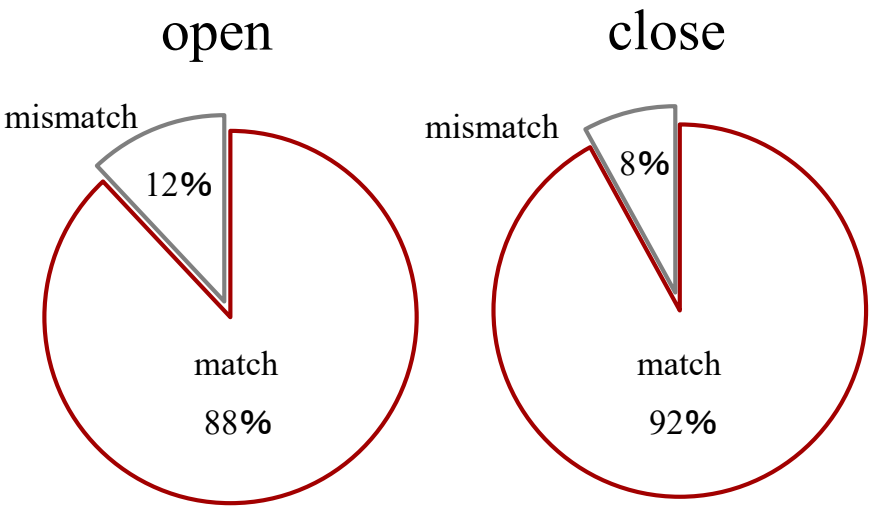


図2　マウス開閉口運動検出 AI による検出結果

(A)マウス開閉口運動検出 AI 構築に使用したデータセット(B) 研究者と 開閉口検出AIモデルの開閉口の判定の一致率を示す。

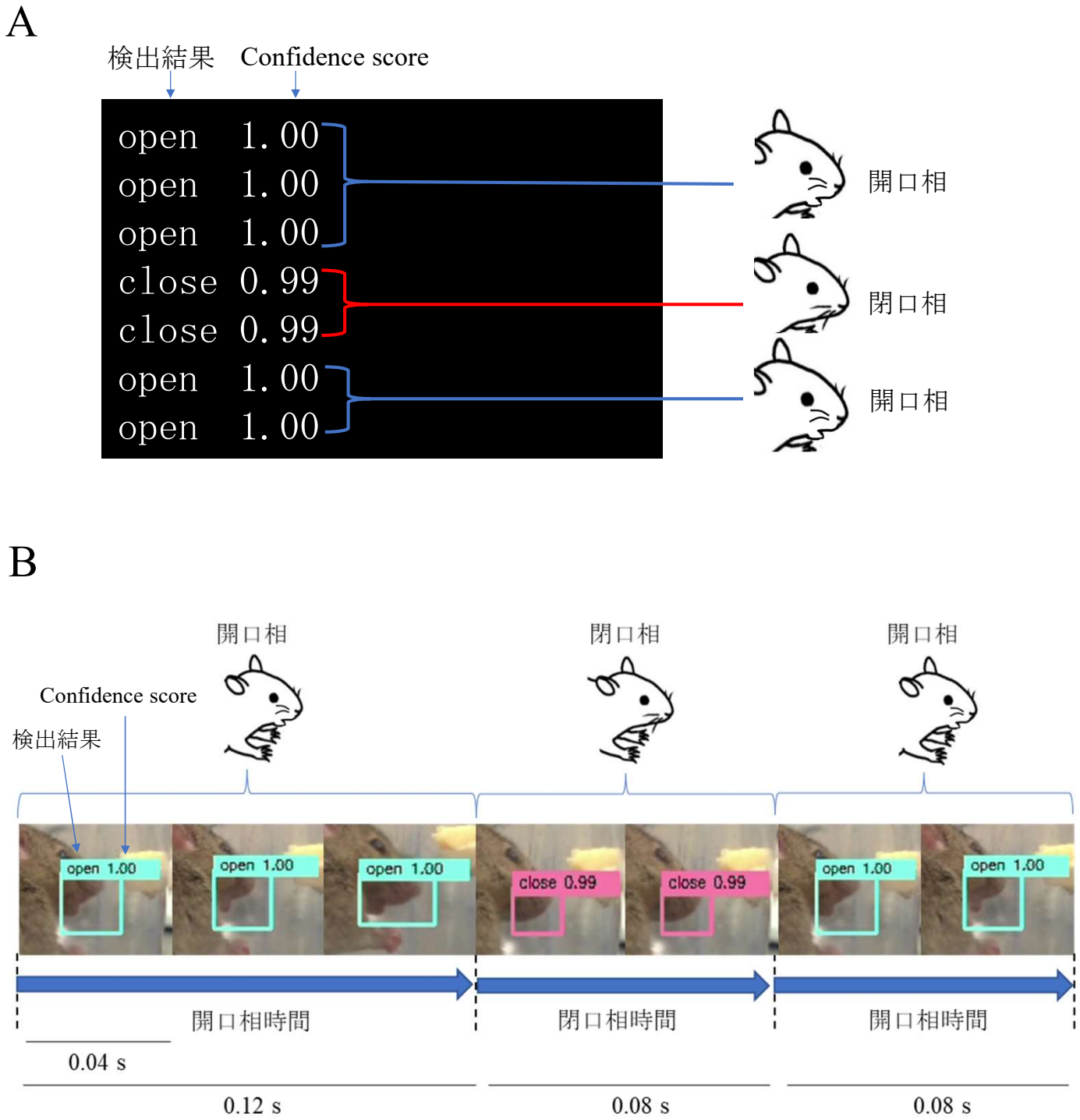


図3　開閉口相時間の測定

(A) マウスの開閉口運動について、SSD による実際の検出結果を示す。開閉口運動の判定結果と信頼度を示す確率であるConfidence Score が表示された。 (B) 開口相時間及び閉口相時間の計測方法を示す。SSD により0.04 秒毎に判定結果が表示されている。0.04秒× (連続して ”open” または “close” と判定された画像の枚数) をそれぞれ開口相時間及び閉口相時間とした。

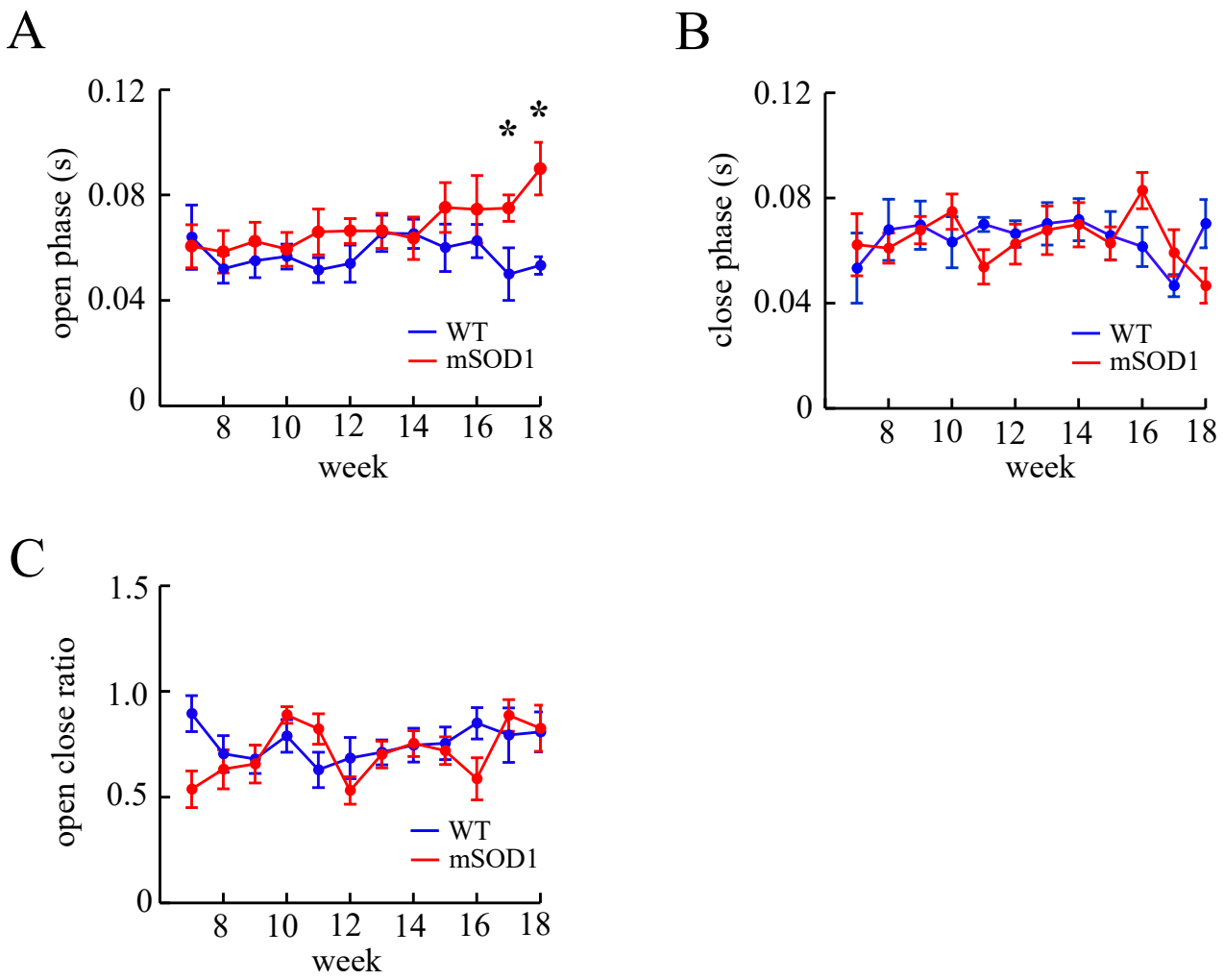


図4:　ALS モデルマウスにおける開閉口運動特性の経時的変化

WT 群 (n=10)および mSOD1 群 (n=9)の7～18週齢における開口相時間、閉口相時間、開閉口比の結果を示す。(A) mSOD1 群における開口相時間は12週齢以降より延長傾向にあり、17週齢以降は有意に延長した。(B,C) 閉口相時間、開閉口比ともに両群間に有意差は認められなかった。

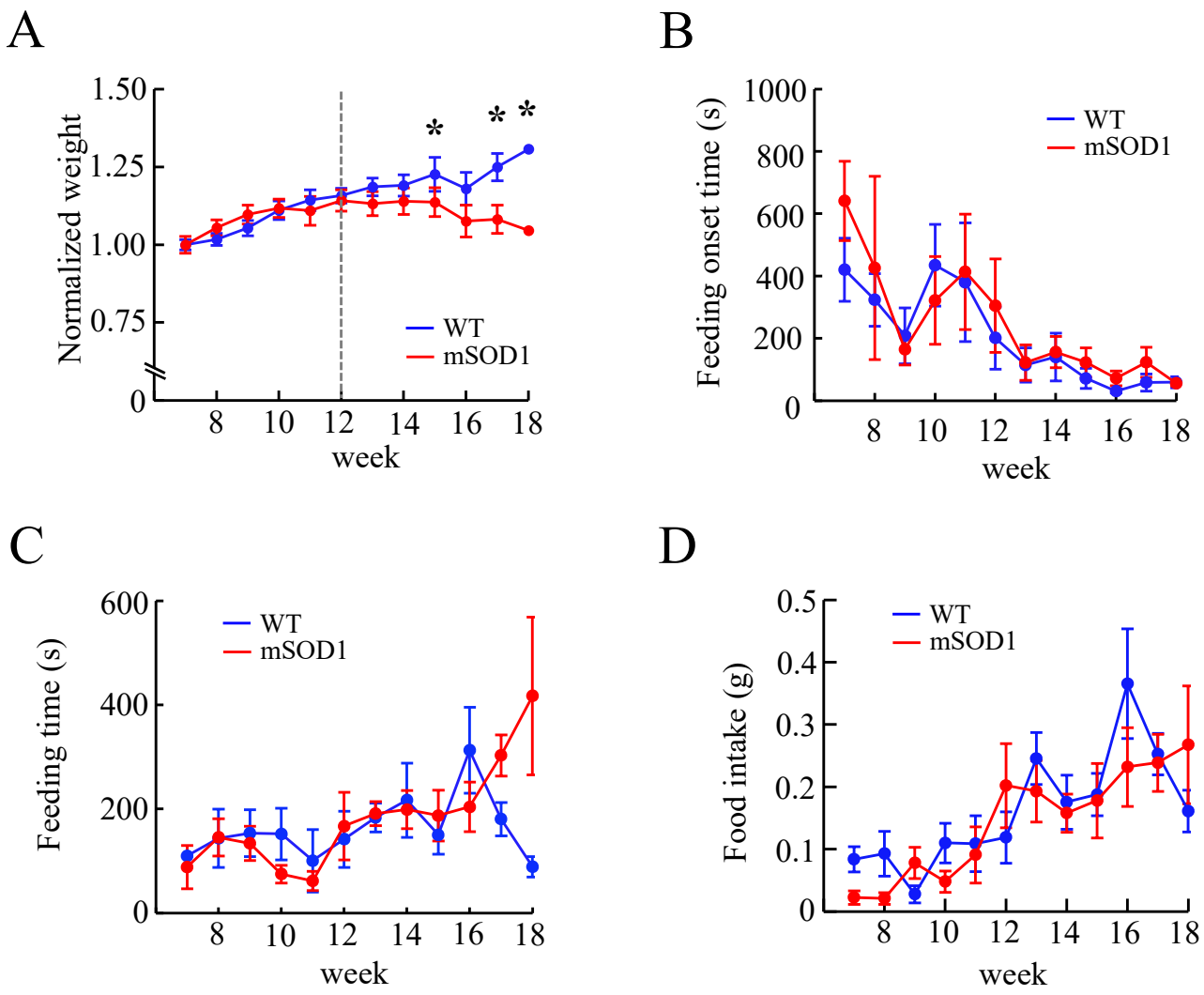


図5:　ALS モデルマウスにおける体重および摂食行動特性の経時的変化

WT 群 (n=10) および mSOD1 群 (n=9) の7～18週齢における Normalized weight、30分あたりの総摂食時間、30分間の総摂食量、摂食開始時間の結果を示す。(A) mSOD1 群における Normalized weight は12週齢でピークに達し、15、17、18週齢で有意に減少した。(B) 摂食開始時間において両群間に有意差は認められなかった。 (C) 30分あたりの総摂食時間について、mSOD1 群に延長傾向を示したが両群間に有意差は認められなかった。(D) 30分間の総摂食量において両群間に有意差は認められなかった。

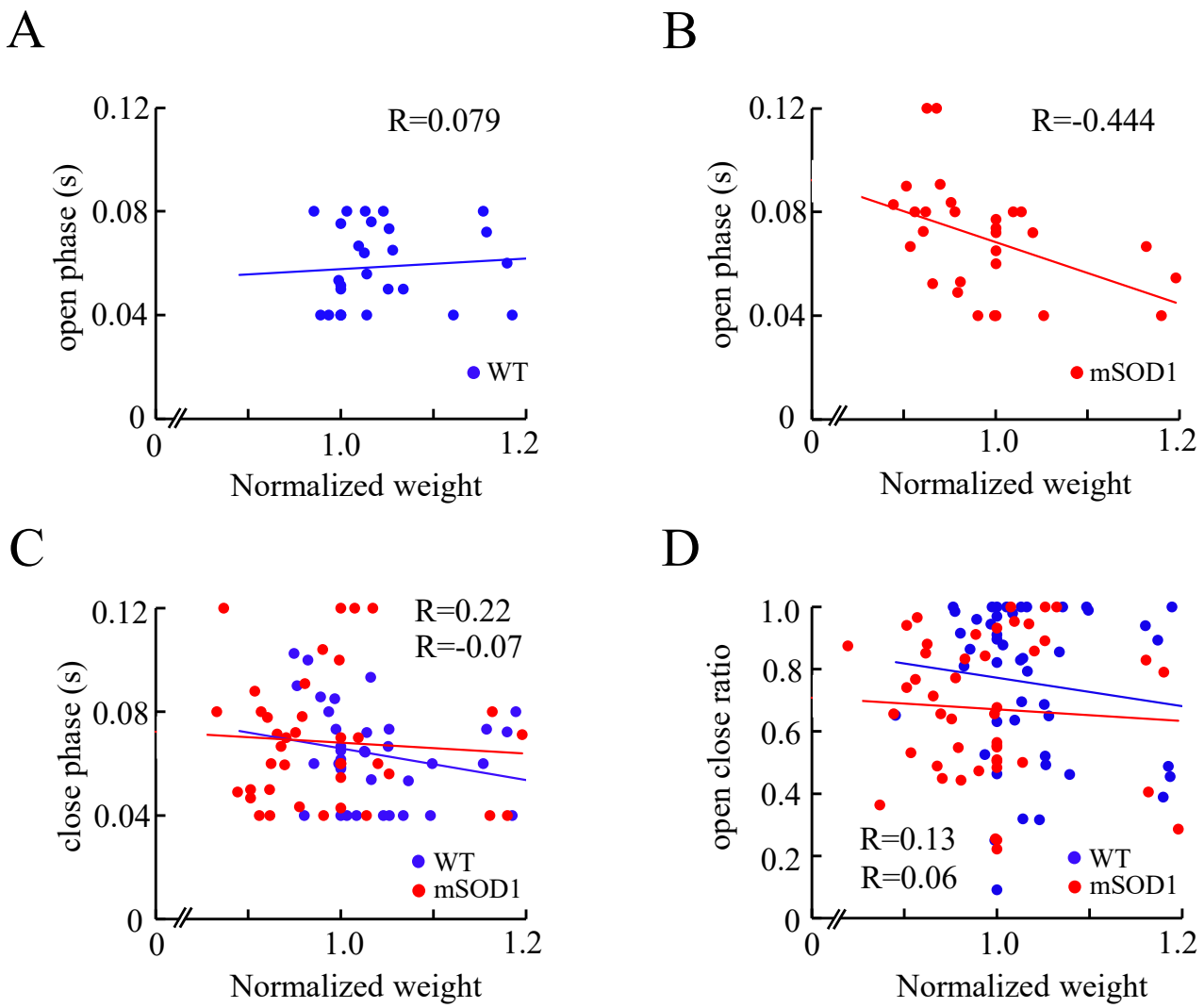


図6:　12週齢以降の ALS モデルマウスにおける体重と開閉口運動との相関関係

WT 群 (n=10) および mSOD1 群 (n=9) の12週齢以降における Normalized weight と開口相時間、閉口相時間、開閉口比との関係を示す。(A,B) WT 群では Normalized weight と開口相時間に相関を認めなかったが、mSOD1 群では負の相関が認められた。(C,D) WT 群、mSOD1 群ともに、正規化体重と閉口相時間、開閉口比との間に相関は認められなかった。

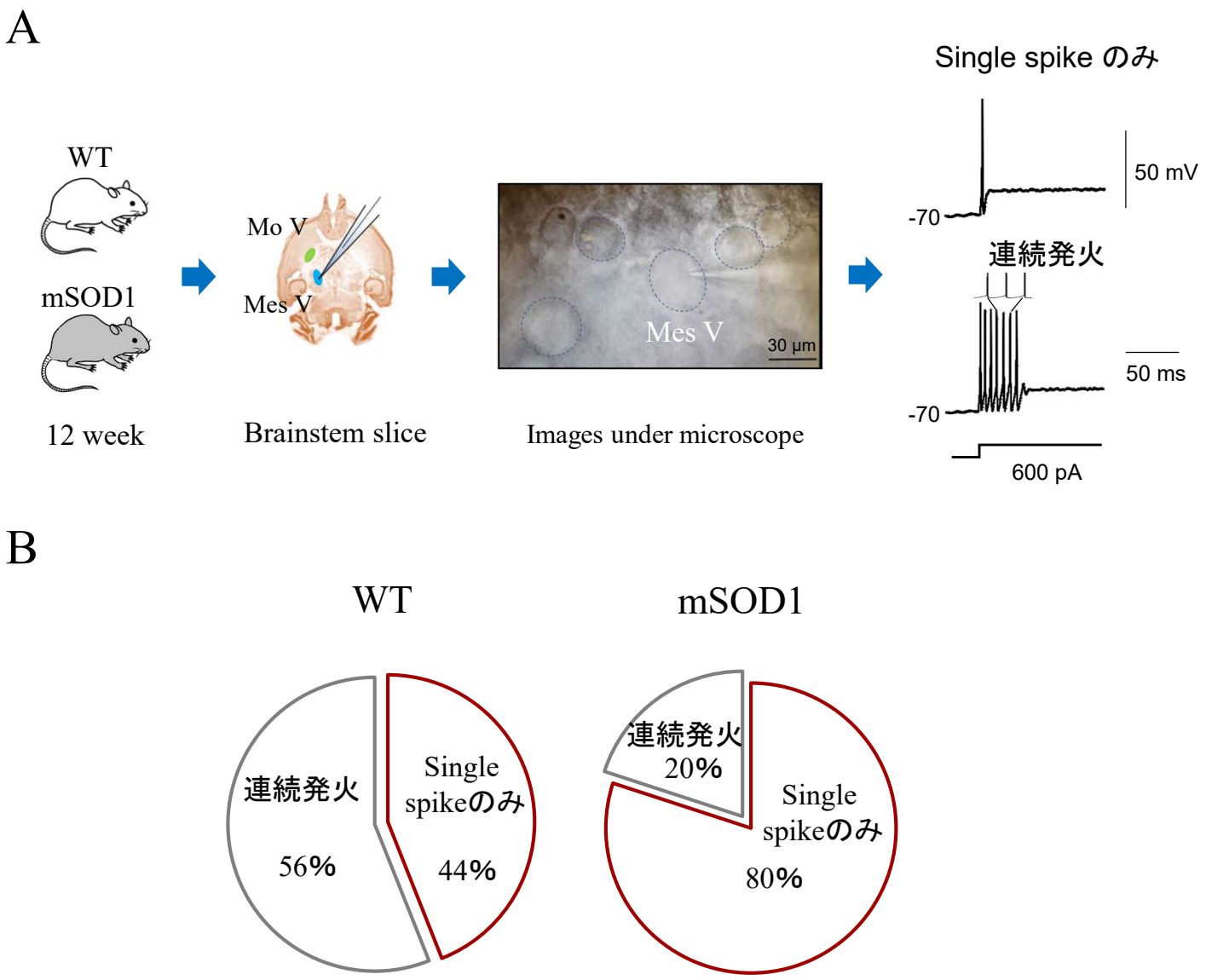


図7:　12週齢 ALS モデルマウスにおける Mes V の Whole-cell 記録

12週齢の WT 群 (n=9) および mSOD1 群 (n=15) におけるMes V の Whole-cell 記録。(A) Single spike のみを示した Mes Vと連続発火を示した Mes V の波形を示す。(B) mSOD1 群では連続発火を示すニューロン の比率が減少傾向を示した。

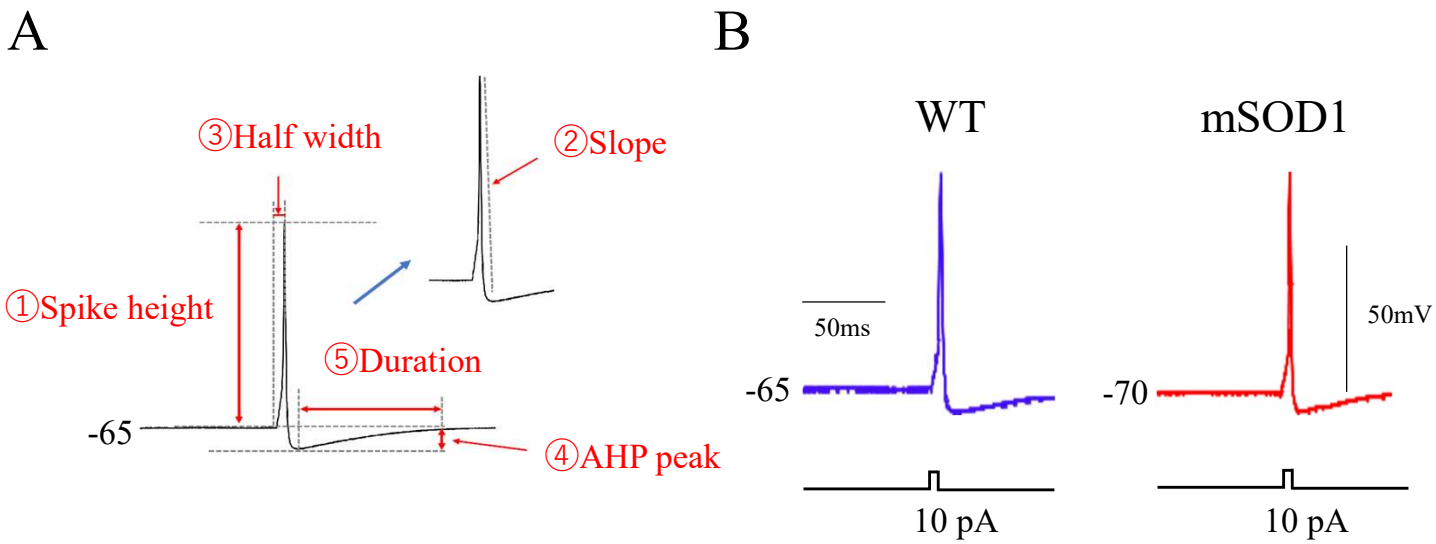


図8:　12週齢 ALS モデルマウスにおける Mes V の AP 特性

12週齢の WT 群 (n=9) および mSOD1 群 (n=15) における Mes V の AP 特性の解析。
(A) AP におけるパラメータを示す。①: スパイクの高さ (Spike height, mV)　②: ①の50 %を示す位置の時間幅 (Half width, ms)　③: スパイクの減衰における最大の傾き (Slope, mV/ms)　④: 後過分極 (AHP) のピーク値 (AHP, peak, mV)　⑤: ④の時間幅 (Duration, ms)　(B) WT と mSOD1 の AP を示す。

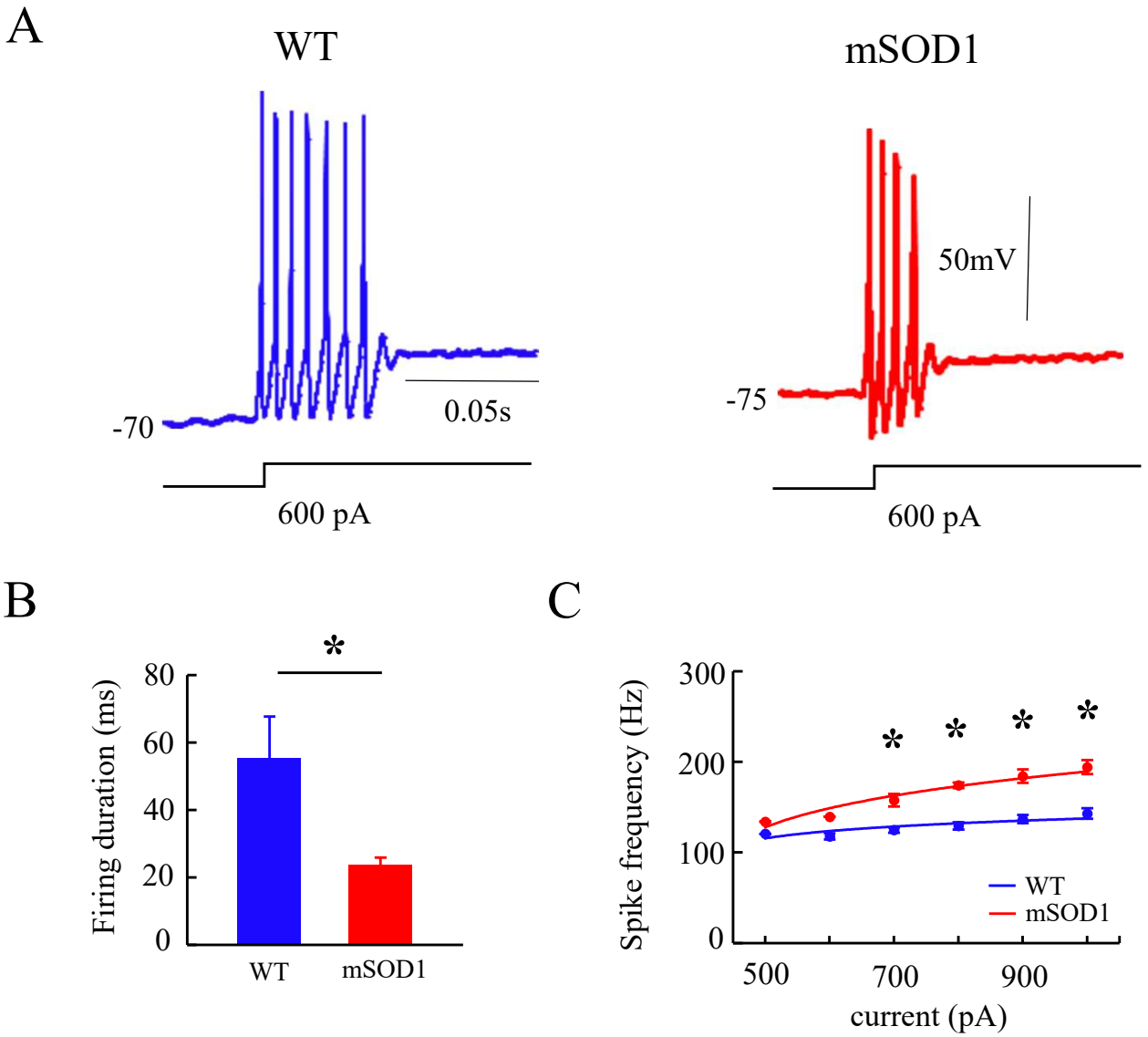


図9:　12週齢 ALS モデルマウスにおける Mes V の連続発火活動特性

12週齢の WT 群 (n=5) および mSOD1 群 (n=3) における Mes V の 連続発火活動記録。
(A) WT と mSOD1 の連続発火活動を示す。(B) mSOD1 群の連続発火活動の持続時間は有意に減少した。(C) mSOD1 群におけるスパイク周波数は 700 pA 以上の入力電流において有意な上昇を認めた。

	WT	mSOD1
mouse	C57BL/6JJmsSlc	B6SJL-Tg (SOD1G93A)1Gur/J
Behavioral physiological Experiments	10	9
Electrophysiological Experiments	5	5

表1：各実験に使用したマウスの個体数

	WT (n=9)	mSOD1 (n=15)
RMP, mV	-52.5 ± 4.5	-84.8 ± 5.7 *
R_{in} , MΩ	26.2 ± 5.8	21.3 ± 6.0
$C_{m,}$ pF	82.1 ± 9.4	105.4 ± 9.6

mean ± SE, Welch's *t*-test

表2：12週齢 ALS モデルマウスにおける Mes V の基本膜特性

	WT (n=9)	mSOD1 (n=15)
AP		
Spike height, mV	79.1 ± 3.1	72.6 ± 2.4
Slope, mV/ms	-0.017 ± 0.006	-0.014 ± 0.007
Half width, ms	0.26 ± 0.04	0.24 ± 0.08
AHP		
AHP peak, mV	-8.8 ± 1.3	8.3 ± 0.5
duration, s	0.03 ± 0.01	0.04 ± 0.01

表3：12週齢 ALS モデルマウスにおける Mes V のAP 特性