

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

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 週齡以降になると、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2 A)。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。

11

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 NaH2PO 4,26 NaHCO₃, 10 glucose, 1 CaCl₂, 5 MgCl₂, 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°C)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 NaH₂PO₄, 26 NaHCO₃, 10 glucose, 2 CaCl₂, 2 MgCl₂ (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 %O2+5%CO2 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 Wholecell 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 MgCl₂, 3 K₂-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(cclamp) 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、posthoc 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 \pm 0.01 s, mSOD1, 0.09 \pm 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 \pm 294.50 s, 18week; WT, 58.83 \pm 17.60 s, mSOD1, 56.00 \pm 8.00 s, repeatedmeasured 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 , 18 week; WT, 89.00 ± 19.49 s, mSOD1, 417.50 ± 151.67 s, repeatedmeasured 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,

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= $0.08, p=0.57, \boxtimes 6A$)、mSOD1 群では負の相関が認められた (r=- $0.44, p=0.01, \boxtimes 6B$)。 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, \boxtimes 6D) $_{\circ}$

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 chisquare 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0~1000pA、500ms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 = 0.020.01, 900 pA; WT, 136.90 \pm 11.10 Hz, mSOD1, 184.30 \pm 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, \boxtimes 9C) $_{\circ}$

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齡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 ロ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 vclamp 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. ImageNettrained 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.

Α

Images of mouth open-close movement



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。



Test set:100 images, N=3



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 Experiment	ments 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 *
$R_{in}, M\Omega$	26.2 ± 5.8	21.3 ± 6.0
C _m , pF	82.1 ± 9.4	105.4 ± 9.6

表2: 12週齢 ALS モデルマウスにおける Mes V の基本膜特性

mean \pm SE, Welch's *t*-test

	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