

平成 21 年 6 月 19 日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18791458  
 研究課題名 (和文) 咀嚼機能障害時の腸管神経系における活性酸素関連機構の解明  
 研究課題名 (英文) Influence of Masticatory Dysfunction on Intracellular Calcium Homeostasis of AH/Type 2 Myenteric Neurons in Guinea-pig Distal Colon  
 研究代表者  
 高橋 聡子 (TAKAHASHI SATOKO)  
 神奈川歯科大学・歯学部・講師  
 研究者番号：30301592

## 研究成果の概要：

「咬み合わせ」と「咀嚼機能」は心身の健康に大きく関与している。最近では、咬み合わせの障害により、「消化不良」だけではなく、胃腸などの消化器に対して直接的な障害が発生する可能性が指摘されている。本研究では、腸管の運動を調節している神経の細胞の活動を調べ、この活動が咬み合わせの不調によって障害されるかどうかについて検討した。この結果、咬み合わせの障害により、腸管の神経細胞の活動が抑制される傾向が認められた。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
18年度	1,500,000	0	1,500,000
19年度	900,000	0	900,000
20年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	330,000	3,830,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・補綴理工系歯学

キーワード：歯科補綴学一般, 咀嚼機能障害, 神経生理学, 腸管神経

## 1. 研究開始当初の背景

結腸や直腸などの下部消化管では上部消化管に比べ血管網や循環血液量が少ないことから、特に活性酸素種による傷害を受けやすいと言われている。一方、咀嚼障害が、単なる消化不良による消化管障害を引き起こすだけでなく、消化管機能そのものに対しても影響を与え

る可能性が示されてきた。これまで、咀嚼機能障害の全身への影響については、中枢神経系や唾液腺などを中心に検討されてきており、また、腸管運動機能に与える影響については、胃のような上部消化管を中心に検討されてきた。このため、咬合高径変化に伴う咀嚼機能障害の下部消化管運動機能に与える影響につ

いての研究は、本研究が初めてである。これまで我々は、腸管神経 AH 細胞のカルシウム動員機構と活性酸素種の影響についての研究を推し進めてきた。この研究を更に掘り下げ、これらの機構に対して、咀嚼機能障害が影響を与えることが解明されれば、咀嚼機能障害を原因とする腸管機能障害の治療に新たな検討を加える可能性があり、これからの歯科医療にとってきわめて有益な情報が得られると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、咀嚼機能障害が、下部消化管に与える影響を明らかにするためにも、まず①腸管神経細胞内のカルシウム動員機構を解明し、この機構に活性酸素種が関与しているかを明らかにすることを最初の目的とした。次に、②咬合高径変化に伴う咀嚼機能障害の腸管運動機能に与える影響を解明し、さらには、③活性酸素種が咀嚼機能障害による腸管運動機能障害に関与しているかどうかを明らかにすることを目的とした。すなわち、腸管神経の中でも特に中枢神経細胞に近い、長時間持続性の後過分極 (AH) を持つ細胞 (AH 細胞) の膜電位変化を指標として、腸管神経細胞が咬合高径変化に伴う咀嚼機能障害によってどのような影響を受けているか、また、それに活性酸素種がどのように関与しているかについて、電気生理学および薬理学的手法を用いて検討することを最終目的とした。さらに、膜電位変化発生時の細胞内カルシウムイオン濃度変化をレーザー顕微鏡を用いて測定し、細胞内カルシウム動員機構への影響を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 腸管神経 AH 細胞内カルシウム動員機構の解明

① 単一神経細胞からの細胞内電位誘導法を用い、腸管神経細胞膜電位のカルシウム動態について生理学的、薬理的に検討を加えた。モルモットから結腸を摘出し、アウエルバッハ神経叢を外縦走筋層上露出した標本を作製した。これを記録チャンバーの底部に固定し、95%O<sub>2</sub>/5%CO<sub>2</sub> 混合ガスで通気し、37°C に加温したクレブス溶液で灌流した。灌流するクレブス溶液には、縦走筋層の自発性収縮と電気刺激による収縮を抑えるために 1 μM ニフェジピンと 1 μM アトロピンを添加した。この標本に、細胞内カルシウムストアのカルシウムチャンネルに直接作用する薬物であるリアノジンとカフェイン、また、カルシウムポンプに作用する薬物であるシクロピアゾン酸、カルシウム依存性カリウムチャンネルのブロッカーであるイベリオトキシン (IbTX) とアパミンを用い、細胞内カルシウム動員機構の解明を試みた。

### ② 共焦点レーザー顕微鏡を用いたカルシウム濃度変化の検討

作製した標本に、生活反応のない細胞に特異的に取り込まれる薬物である sulforhodamin B を負荷し、さらにカルシウム蛍光指示薬である fluo-4-AM を負荷した。この作業は、細胞の傷害を最小限にするために、通気した冷却クレブス内で行った。

洗浄後、チャンバーに標本を固定し、95%O<sub>2</sub>/5%CO<sub>2</sub> 混合ガスで通気し、冷却したクレブス溶液で灌流した。レーザーの波長は 590, 515 nm に設定した。

溶液には 1 μM アトロピン、1 μM ニフェジピン、0.2 μM テトロドトキシン (TTX) を添加して、標本の収縮を抑制した。

### (2) 腸管神経 AH 細胞に対する活性酸素種関

## 連機構の解明

### ① 単一神経細胞からの細胞内電位誘導法

(1)と同様に実験を行い、灌流液中にヒポキサンチン(HX)とキサンチンオキシダーゼ(XO)を加え、活性酸素種を外因性に発生させその影響を検討した。各種ラジカルスカベンジャー(スーパーオキシドディスムターゼ,カタラーゼ, DMSO, ディフェロキサミン)を用い、活性酸素種についても検討を加えた。

### ② 共焦点レーザー顕微鏡を用いたカルシウム濃度変化の検討

活性酸素種は、(1)と同様に、灌流液中にHX+XO加えることで発生させ、その影響を検討した。

### ③ 微小発光測定装置を用いた細胞内活性酸素種の測定

作製した標本をチャンバーに固定し、冷却したクレブス溶液満たした。スーパーオキシドラジカル( $O_2^{\cdot-}$ )を検知する物質である  $3 \mu\text{M}$  MPEC と、過酸化水素( $H_2O_2$ )、ヒドロキシラジカル( $HO^{\cdot}$ )等複数のラジカル種を検知する  $700 \mu\text{M}$  ルミノールを予めチャンバー内に添加し、腸管神経の情報伝達ペプチドとして知られている  $0.2 \mu\text{M}$  のサブスタンスPをチャンバー内に滴下することにより刺激を加えた。

溶液には  $1 \mu\text{M}$  アトロピン,  $1 \mu\text{M}$  ニフェジピン,  $0.2 \mu\text{M}$  TTX, を添加して、標本の収縮を抑制した。

## (3) 咬合高径を変化させたモルモットの腸管神経 AH 細胞の変化の検討

### ① 単一神経細胞からの細胞内電位誘導法を用い

(1)と同様に活動電位を測定し、咬合高径を変化させることによって、腸管神経 AH 細胞の活動電位そのものが影響を受けているかどうかを検討した。

## 4. 研究成果

### (1) 腸管神経 AH 細胞内カルシウム動員機構の解明

#### ① 単一神経細胞における電気生理学的

## 手法を用いた検討

AH 神経細胞に、細胞内カルシウムストアである ER からのカルシウム放出を誘発する薬物であるカフェインを作用させると、カフェインは用量依存性に細胞膜抵抗の減少を伴った一過性の過分極性応答と、それに続くゆっくりとした脱分極応答を誘発した。

これらの応答は、細胞膜に存在するカルシウム依存性カリウムチャネルのブロッカーであるイベリオトキシンによって抑制され、アパミンには抑制されなかった。

また、細胞内ストアのカルシウム誘導性カルシウム遊離チャネルをブロックする作用を持つリアノジンをを用いると、活動電位の AH の早い成分は影響を受けず、遅い成分のみが抑制された。さらに、カルシウムストアのポンプを抑制する働きを持つシクロピアゾン酸(CPA)でも、AH の早い成分は影響を受けず、遅い成分のみが抑制された。

一方、自発性に過分極応答を繰り返す細胞に対してもリアノジンは抑制効果を示したが、TTX を加えてもこの過分極応答は抑制されなかった。

今回の実験で用いたカフェインは、神経細胞内小胞体(ER)のリアノジン感受性カルシウムチャネルからカルシウムを放出させる作用をもつことが知られている。カフェインによって、過分極性と脱分極性の二相性反応が観察されたことから、AH 細胞内に ER が存在し、ER からのカルシウム放出により膜のカルシウム依存性カリウムチャネルが開放することが示唆された。また、この反応がカルシウム依存性カリウムチャネルのブロッカーである IbTX によって抑制されアパミンによっては抑制されなかったことからカルシウム依存性カリウムチャネルはコンダクタンスの大きいタイプである可能性が高い。

さらに、活動電位の後に続く AH の遅い

成分だけがリアノジンおよび CPA によって抑制されたことから、AH 細胞にはリアノジン感受性のカルシウムストアが存在することが確認され、さらに、AH の遅い成分はストアからのカルシウムによるカルシウム依存性カリウムチャネルの開放により発生していることが示唆された。また、CPA が  $IP_3$  感受性のストアに特異的に作用することから、 $IP_3$  感受性のストアの存在も確認され、 $IP_3$  感受性ストアとリアノジン感受性ストアが何らかの形でリンクしている可能性が高い。

## ②共焦点レーザー顕微鏡を用いたカルシウム濃度変化の検討

腸管神経叢内に sulforhodamin B と fluo-4-AM を負荷して、590, 515 nm の波長のレーザーを照射すると、590 nm で生活反応のない細胞が、515 nm でカルシウムイオンが検知できた。カフェインを灌流させると、カルシウムイオンの局所的な移動が観察され、ER からのカルシウムイオン放出が確認できた。

## (2)AH 細胞に対する活性酸素種の影響

### ①単一神経細胞における電気生理学的手法を用いた検討

モルモット下行結腸壁内にある AH 神経細胞に対し HX と XO を含むクレブス溶液 (HX+XO) を灌流させると、これまでに我々が報告したように、一過性の過分極応答とそれに続く持続性の脱分極電位が観察された。これらの反応は、過分極性ステップパルスを用いた実験より、細胞膜上のカリウムチャネルを介することが確認され、さらに HX+XO による膜電位の過分極と脱分極の際には、細胞外電気刺激および細胞内への脱分極パルスによって発生させた活動電位の振幅の減少がしばしば観察された。これらの振幅の減少は、TTX をクレブス内に添加してナトリウムチャネルを抑制して、カルシウム性活動電位のみを記録

した際にも観察された。

これらの応答は DMSO によって抑制されたため、ヒドロキシラジカルの関与が示唆された。

一方、鉄をキレートしてヒドロキシラジカルを阻害するディフェロキサミンを用いると、低濃度であるにもかかわらず、AH 細胞の膜電位が連続した過分極を繰り返した。このことから、鉄をキレートしたために、膜を透過しやすい過酸化水素が発生し、過分極応答を起こした可能性が考えられる。

## ②共焦点レーザー顕微鏡を用いたカルシウム濃度変化の検討

腸管神経叢内に sulforhodamin B と fluo-4-AM を負荷して、590, 515 nm の波長のレーザーを照射すると、590 nm で生活反応のない細胞が、515 nm でカルシウムイオンが検知できた。HX+XO を灌流させると、カルシウムイオンの局所的な移動が観察できた。これは、低濃度活性酸素種によりカルシウムイオンの異動が起こることを示唆している。

## ③微小発光測定装置を用いた細胞内 ROS の測定

0.2  $\mu$ M のサブスタンス P をチャンバー内に滴下して腸管神経叢を刺激すると、3  $\mu$ M MPEC を予め添加したチャンバーでも、700  $\mu$ M ルミノールを予め添加したチャンバーでも、微小発光が観察できた。これらの微小発光では部位によっての違いが認められた。

今回、共焦点顕微鏡を用いて、外因性に発生させた ROS が細胞内のカルシウムイオン濃度を部分的に変化させることを確認し、これらのカルシウム動員機構に ROS が関与している可能性を示すと共に、微小発光装置を用いた実験により、生理的刺激によって、ROS が神経細胞内で発生している可能性も示唆することができた。また、(2)-①の実験のディフェロキサミンの単独

適用で、連続した過分極反応が見られたことも傍証となるであろう。

### (3)咬合高径変化の神経細胞内 AH 細胞活動電位変化の検討

#### 単一神経細胞における電気生理学的手法を用いた検討

ハートレー系雄性モルモット(250g)の臼歯部にレジンを添加し、咬合高径を変化させた状態で1~2週間飼育した。咬合高径を高くしたモルモットを咀嚼障害モデルと仮定し、これらの標本を用いて、(1)と同様な手法で実験を行い、活動電位の変化を検討した。

咀嚼障害モデルとコントロールとの間には、体重の増減に差は見られなかった。咀嚼障害モデルでは、腸管神経 AH 細胞の活動電位の立ち上がりの遅延が見られ、活動電位の持続時間には変化が認められなかった。このことから、咀嚼障害により AH 細胞の活動電位が発生しにくい状態になっていると考えられる。さらに静止膜電位そのものが過分極傾向に傾いている可能性がある。

しかし、その抑制反応により、実際の腸管機能にどのような変化が起きるのかは確認できていない。実際に咀嚼機能障害により結腸にも変化が認められることが知られており、これらの障害に腸管神経系の活動が関与していると考えられる。咬合高径の変化の程度、あるいは障害期間、動物種によりこれらの変化に差が出ることも考えられる。

本研究で得られた結果から、腸管神経細胞には ER が存在し、細胞内カルシウム動態によって膜電位が維持されていることになる。そして低濃度 ROS は細胞を傷害するだけでなく、細胞内カルシウム動態の制御因子として、膜電位維持に関与している可能性が示唆された。これらの機構に対して、口腔内の変化が影響を及ぼすかどうかを知ることが、全身と口腔を繋ぐという

意味でも歯科医療の発展につながると考えられる。今回の結果では、咬合高径を高くすることによって腸管神経 AH 細胞の活動電位の立ち上がりが抑制されるという結果を得たが、どの程度の抑制で実際に消化管の機能障害となるのかを知る必要がある。機能的に障害が出るには、ある一定の期間、変化を要するとも考えられる。しかしながら、実際には神経系に傷害が出るに至らなくとも、腸管に対して影響を与えている可能性が確認された。すなわち、腸管神経系あるいは腸管機能そのものに咀嚼機能障害が影響していることを示唆することができた。この機構を解明すべく、更に検討を続ける。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

高橋聡子(TAKAHASHI SATOKO)  
神奈川歯科大学・歯学部・講師  
研究者番号：30301592