

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 11 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23390439

研究課題名(和文) 抗ヒスタミン薬を応用した新しい抗ブラキシズム療法の確立

研究課題名(英文) Roles played by histamine in strenuous or prolonged masseter muscle activity.

研究代表者

渡辺 誠 (Watanabe, Makoto)

東北大学・歯学研究科(研究院)・客員教授

研究者番号：80091768

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円

研究成果の概要(和文)：顎関節症患者への抗ヒスタミン薬の治療効果に基づき、筋活動がヒスタミン合成酵素(HDC)の発現を介して、運動機能の維持と痛みにも関与するとの仮説に基づき実験を行った。咀嚼様運動をマウスへと負荷した結果、咬筋でのHDCのmRNA発現と活性が咬筋運動量と相関して上昇した。抗ヒスタミン薬(ピラミン)投与で咬筋活動量は低下したため、ヒスタミン関連遺伝子欠損マウスを用いて同様に検討を行った。結果、ヒスタミン関連遺伝子欠損マウスでは、咬筋運動量が有意に低下した。以上の結果は、ブラキシズムといった過剰な咬筋活動により生産されるヒスタミンが微小循環を維持する役割を担う反面、遅発性疼痛に関与することを示唆する。

研究成果の概要(英文)：Bruxism and/or clenching, resulting in fatigue or dysfunction of masseter muscles (MM), may cause temporomandibular disorders (TMD). Functional support of the microcirculation is critical for prolonged muscle activity. Histamine is a regulator of the microcirculation and is supplied by release from its stores and/or by de novo production via the induction of histidine decarboxylase (HDC). In the present study, we examined the roles of histamine and HDC in MM activity. Experiments were conducted using our R+G+ model. In addition that fexofenadine (a histamine H1 receptor antagonist) reduced MM activity, both H1 receptor-deficient and HDC-deficient mice exhibited low MM activity. Prolonged R+G+ induced HDC activity in MM. These results suggest that: (i) peripheral histamine supports strenuous MM activity; (ii) strenuous MM activity stimulates mast cells to release histamine and to induce HDC; and (iii) peripheral histamine H1 receptor antagonists may be effective in treating TMD.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：顎関節症 ブラキシズム ヒスタミン 筋疲労 咬筋

1. 研究開始当初の背景

近年、顎関節症に伴う慢性筋痛が増加傾向にあり、うつ発症の危険因子となることから社会問題となっている。その多くは筋・筋膜性疼痛疾患と同様の症状を有し²⁾、背景にブラキシズムの存在があるとされている。ブラキシズムは顎顔面領域の筋、特に咀嚼筋組織への慢性的な過負荷をもたらす、組織内の筋線維内に微小外傷を蓄積させ、筋の硬結やその帰結となる慢性疼痛を引き起こすと認識されている。

しかしながら、睡眠時のブラキシズムに関してはその発症メカニズムも未だ不明な点が多く、その予防法も存在しない。唯一の治療法として各種スプリントによる歯列や筋、顎関節の負担軽減という対症療法があるが、それに関しても逆にブラキシズムを悪化させるとの可能性が示唆されている。以上のことから、口腔諸組織に障害となる重篤なブラキシズムに対する新規治療法の確立は、臨床の現場において強く求められている。

また、我々は筋症状を有する顎関節症患者に抗ヒスタミン薬を投与し、筋症状の改善に著効することを過去に報告したが、NSAIDsとの比較からも、その作用が単純な鎮痛作用によりもたらされるものではなく、他の作用起序の存在を示唆するものであった。

2. 研究の目的

本研究ではブラキシズム抑制とそれに伴う筋症状の改善を目的として、ブラキシズム患者への抗ヒスタミン薬によるその抑制効果を示すことに加え、抗ヒスタミン薬による咀嚼筋活動低下のメカニズムを動物実験で明らかとすることで、対ブラキシズムの新規治療法の確立が可能となる。

運動に伴い筋組織にはヒスタミン合成酵素 histidine decarboxylase (HDC) を誘導され、ヒスタミン生産が増加する。このことから、HDC は筋疲労のマーカー分子となること

が報告されている。運動に伴うヒスタミンの主な作用は末梢血管の透過性亢進と考えられ、筋肉微小循環の維持に大きな役割を果たすと推察されている。すなわち、運動に伴う筋組織の低酸素状態、および代謝産物の蓄積などを改善し、筋の活動量を維持する作用があるとの仮説だが、筋疲労に伴い産生されるヒスタミンの機能的役割について明らかとした研究はない。

本研究では筋活動に伴い産生されるヒスタミンが、筋活動を維持するうえで必須であることを明らかとすることを目的とする。

3. 研究の方法

5週齢の雄性マウス、6系統 (BALB/c、C57BL/6、ヒスチジン脱炭酸酵素 (HDC) 遺伝子欠損マウス、ヒスタミン H1 受容体 (H1R) 遺伝子欠損マウス、肥満細胞欠損マウス (W/WV)) を用いて実験を行った。

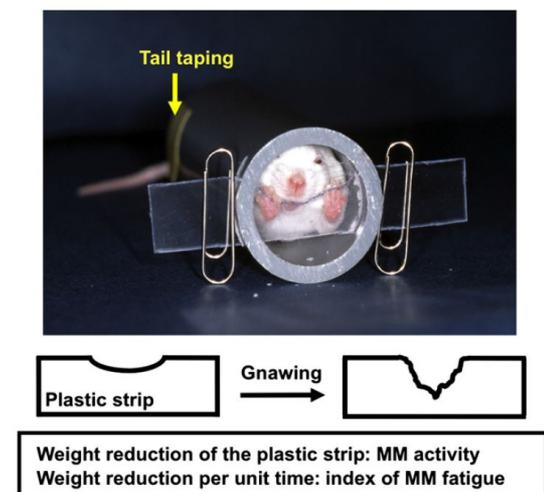


図1. マウスをプラスチック板(幅: 1.5 cm, 厚さ: 1.0 mm)にて前方を遮蔽した円筒(径: 2.5 cm, 長さ: 10 cm, プラスチック製)内に入れると、マウスは咀嚼様運動を開始する。これは“自発的”な運動であり、生理的な筋肉疲労を解析可能な実験系といえる。

(1) 咬筋活動量の評価法

マウスを細い筒に入れ、出口をプラスチック板で閉じると、マウスは脱走用の隙間を作

るため、この板を長時間咬み続ける（図1、これを R+G+ と仮称）。実験前後の板の重量差は咬筋運動量を反映する。この実験系を用いて、咬筋の活動量や咀嚼疲労について検討した。

(2) 抗ヒスタミン薬の投与

Pyrilamine (2.4mg/ml で saline に溶解) と Fexofenadine (4.0mg/ml で saline-0.5% (vol/vol) Tween80 に溶解) をマウスに 0.1 ml/10g で腹腔注射し、投与した。

(3) HDC 活性の測定

摘出組織は -80 で使用前まで保存した。マウス筋組織を速やかにリン酸化セルロースを含む酵素溶液中でホモゲナイズし、組織中の既存ヒスタミンを取り除き、HDC を主体とした抽出液を採取する。氷冷下で HDC を酵素反応液と反応させ、蛍光体として検出される合成ヒスタミン量により、HDC 活性の測定を行った。

(4) 定量 PCR による HDC mRNA レベルの解析

HDC に対する特異的プライマーを作製し、realtime RT-PCR 法により定量的解析を行った。Reference gene としては eEF1a1 を用いた。

(5) 強制歩行による疲労耐性

電動回転式トレッドミルにて強制歩行 (8.0s/回転) させ、脱落の早さによりその疲労耐性をみた。

(6) 統計解析

Student's T-test, もしくは Two-way ANOVA を用いて検討を行った ($p < 0.05$ により判定)。

4. 研究成果

咀嚼様運動にともない、咬筋における HDC の発現および活性は有意な上昇を示した。その上昇はトレーニングによっても著明な低下を示されず、従来の疲労分子 (IL-6 など) とは異なる動態が示唆された。また、咀嚼様運動負荷実験を行い、1 時間辺りの咀嚼活動量を計測した。ヒスタミン関連遺伝子欠損マウスでは、咀嚼様運動の活動量が有意に低い値を示した。以上の結果から、咀嚼様運動においてはヒスタミンの疲労耐性への関与が示された。

次に BALB/c のマウスを用いて、抗ヒスタミン薬の投与 30 分後に 1 時間の咀嚼様運動負荷を行い、その噛み砕き量を計測した。結果として、抗ヒスタミン薬の投与により、咀嚼様運動量が低下した。

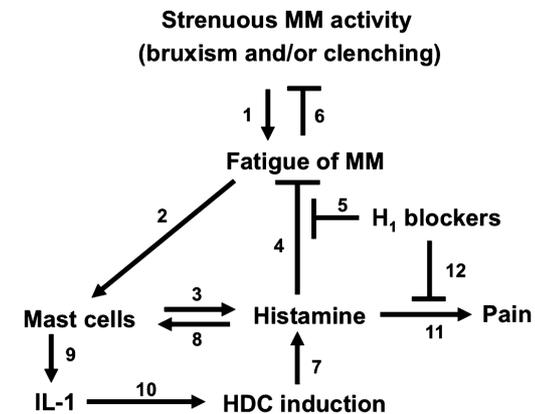


図2. ヒスタミンによる筋活動維持に関する仮説。ブラキシズムの様な高い筋活動ではヒスタミンが中心となって維持する機構がある一方で、遅発性に痛みなどを生じる可能性が考えられる（雑誌論文より引用）。

我々の結果は運動時に産生されるヒスタミンが末梢血管の浸透性亢進を介して、末梢組織の微小循環を活性化し、結果として運動機能（咀嚼運動）の持久性を高める役割を果たすことを示している（図2）。本研究の結果は、ブラキシズム抑制とそれに伴う筋症状の改善を目的とする抗ヒスタミン薬を用いた治療が有効であることを裏付けるエビデンスを提供するものである。

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)

[雑誌論文](計10件)

Nagai Y, Shiraishi D, Tanaka Y, Nagasawa Y, Ohwada S, Shimauchi H, Aso H, Endo Y, Sugawara S. Transportation of sublingual antigens across sublingual ductal epithelial cells to the ductal antigen-presenting cells in mice. *Clin Exp Allergy*. 査読有, 2015 45(3):677-86.

DOI: 10.1111/cea.12329.

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/cea.12329/abstract>

Kawano M, Nakayama M, Aoshima Y, Nakamura K, Ono M, Nishiya T, Nakamura S, Takeda Y, Dobashi A, Takahashi A, Endo M, Ito A, Ueda K, Sato N, Higuchi S, Kondo T, Hashimoto S, Watanabe M, Watanabe M, Takahashi T, Sasaki K, Nakamura M, Sasazuki T, Narushima T, Suzuki R, Ogasawara K. NKG2D⁺ IFN- γ ⁺ CD8⁺ T cells are responsible for palladium allergy. *PLoS One*. 査読有, 2014 9(2):e86810.

DOI: 10.1371/journal.pone.0086810. eCollection 2014.

<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0086810>
Tsuchiya M, Niijima-Yaoita F, Yoneda H, Chiba K, Tsuchiya S, Hagiwara Y, Sasaki K, Sugawara S, Endo Y, Tan-No K, Watanabe M. Long-term feeding on powdered food causes hyperglycemia and signs of systemic illness in mice. *Life Sci*. 査読有, 2014 103(1):8-14.

DOI: 10.1016/j.lfs.2014.03.022.

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0024320514003610>

Bando K, Takahashi H, Kinbara M, Tanaka Y, Kuroishi T, Sasaki K, Takano-Yamamoto T, Sugawara S, Endo Y. Resin monomers act as adjuvants in Ni-induced allergic dermatitis in vivo. *J Dent Res*. 2014 査読有, 93(11):1101-7. DOI: 10.1177/0022034514552674.

<http://jdr.sagepub.com/content/93/11/1101.long>

Okada S, Kiyama T, Sato E, Tanaka Y, Oizumi T, Kuroishi T, Takahashi T, Sasaki K, Sugawara S, Endo Y. Inhibition of phosphate transporters ameliorates the inflammatory and necrotic side effects of the nitrogen-containing bisphosphonate zoledronate in mice. *Tohoku J Exp Med*. 査読有, 2013 231(2):145-58.

https://www.jstage.jst.go.jp/article/tjem/231/2/231_145/_article

Kiyama T, Okada S, Tanaka Y, Kim S, Bando K, Hasegawa M, Yamaguchi K, Takano-Yamamoto T, Sasaki K, Sugawara S, Endo Y. Inflammatory and necrotic effects of minodronate, a nitrogen-containing bisphosphonate, in mice. *Tohoku J Exp Med*. 査読有, 2013 230(3):141-9.

Kuroishi T, Bando K, Endo Y, Sugawara S. Metal allergens induce nitric oxide production by mouse dermal fibroblasts via the hypoxia-inducible factor-2 α -dependent pathway. *Toxicol Sci*. 査読有, 2013 135(1):119-28.

DOI: 10.1093/toxsci/kft142.

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1440-1681.12167/pdf>

Tanaka Y, Nagai Y, Dohdoh M, Oizumi T,

Ohki A, Kuroishi T, Sugawara S, Endo Y.
In vitro cytotoxicity of zoledronate
(nitrogen-containing bisphosphonate:
NBP) and/or etidronate (non-NBP) in
tumour cells and periodontal cells.
Arch Oral Biol. 2013 査読有 ,
58(6):628-37.

DOI:

10.1016/j.archoralbio.2012.11.010.

[http://www.sciencedirect.com/science
/article/pii/S0003996912004086](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003996912004086)

Yabe Y, Hagiwara Y, Suda H, Ando A,
Onoda Y, Tsuchiya M, Hatori K, Itoi E.
Joint immobilization induced hypoxic
and inflammatory conditions in rat
knee joints. Connect Tissue Res. 2013
査読有 , 54(3):210-7.

DOI: 10.3109/03008207.2013.786056.

Yoneda H, Nijima-Yaoita F, Tsuchiya M,
Kumamoto H, Watanabe M, Ohtsu H, Yanai
K, Tadano T, Sasaki K, Sugawara S, Endo
Y. Roles played by histamine in
strenuous or prolonged masseter muscle
activity in mice. Clin Exp Pharmacol
Physiol. 査読有 , 2013 40:848-55.

DOI: 10.1111/1440-1681.12167.

[http://onlinelibrary.wiley.com/doi/1
0.1111/1440-1681.12167/pdf](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1440-1681.12167/pdf)

[学会発表](計6件)

千葉航, 土谷昌広, 渡辺誠, 佐々木啓一,
坪井明人, 服部佳功. 長期飼育における
粉末食のマウス糖代謝機構への影響と行
動異常の誘発に関する研究. 第56回歯科
基礎医学会学術大会・総会, 2014/9/26,
福岡.

千葉航, 土谷昌広, 八百板(新島)富紀枝,
米田博行, 渡辺誠, 佐々木啓一. 粉末食
飼育はマウスの糖代謝機構を障害し, 行
動異常を誘発する. 日本老年歯科医学会

第24回学術大会, 2013/6/4~6/6, 大阪.
八百板富紀枝, 荒井香, 下道麻夏, 齊藤
貴之, 土谷昌広, 齊藤弘子, 村井繁夫,
荒井裕一朗, 根本互, 中川西修, 只野武,
丹野孝一. 粉末食飼育マウスにおける
Social interactionの障害について. 平
成25年度東北薬科大学創薬研究センタ
ーシンポジウム, 2013/5/25, 仙台.

米田博行, 土谷昌広, 佐々木啓一, 菅原
俊二, 遠藤康男: "マウス長時間噛み砕
き運動へのヒスタミンの関与に関する研
究" 第53回歯科基礎医学会学術大会・総
会. 2011/9/30. 岐阜

米田博行, 土谷昌広, 佐々木啓一, 菅原
俊二, 遠藤康男: "マウス長時間噛み砕
き運動へのヒスタミンの関与: プラキシ
ズム・顎関節症の抗ヒスタミン薬による
予防・治療に向けた基礎研究" 第59回東
北大学歯学会. 2011/6/10. 仙台

土谷昌広, 米田博行, 木山朋美, 佐々木
啓一: "咀嚼運動時の咬筋における IL1の
役割" 第120回日本補綴歯科学会.
2011/5/21. 広島

[図書](計1件)

渡辺誠 他、アーク出版、特集/「向
精神薬の副作用と対策 Update」第43巻
11号、2014.

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況（計0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

渡辺 誠 (WATANABE, Makoto)

東北大学・大学院歯学研究科・客員教授

研究者番号：80091768

(2)研究分担者

遠藤 康男 (ENDO, Yasuo)

東北大学・大学院歯学研究科・教育支援者

研究者番号：50005039

山口 哲史 (YAMAGUCHI, Satoshi)

東北大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：50400263

土谷 昌広 (TSUCHIYA, Masahiro)

東北大学・大学院歯学研究科・大学院非常
勤講師

研究者番号：60372322

(3)連携研究者