

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：30110

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792099

研究課題名(和文)咀嚼刺激が脳梗塞後の抗酸化能低下の回復に及ぼす影響

研究課題名(英文)Effect of mastication on the recovery from compromised antioxidant ability induced by cerebral infarction

研究代表者

川西 克弥(KAWANISHI, Katsuya)

北海道医療大学・歯学部・講師

研究者番号：10438377

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、咬合・咀嚼動態の変化が脳梗塞後遺障害による脳内抗酸化能の低下からの回復に寄与できるか否かを検討するため、脳梗塞モデルラットを用いて固形飼育飼料を摂取する咀嚼刺激群と液体飼育飼料を摂取する対照群とに分けて脳内抗酸化能を測定した。

固形飼育飼料の摂取に伴う咀嚼刺激は、脳梗塞後の脳内抗酸化能の低下からの回復に寄与している可能性が示唆された。咀嚼は脳梗塞後のリハビリテーションとして役立つことが予想される。

研究成果の概要(英文)：This study was performed to investigate whether masticatory activity contributes the functional recovery from stroke-induced compromised antioxidant ability of brain in middle cerebral artery occlusion rats. These results suggested that the mastication associated with by solid feeding affect antioxidant ability, and might be useful for the rehabilitation of stroke-induced dysfunction.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・補綴系歯学

キーワード：歯学 咀嚼 脳梗塞 抗酸化能 アスコルビン酸 尿酸

1. 研究開始当初の背景

近年、歯の喪失による咬合・咀嚼機能の低下が脳内に様々な変化を及ぼしていることが多数報告されている。また、咀嚼機能があらゆる病態のリハビリに効果を示す研究は少しずつ行われるようになってきているが、その詳細なメカニズムや効果については未だ明らかとされていない。なかでも脳神経科学分野における脳梗塞のリハビリが注目されている。従来、脳梗塞後のリハビリでは麻痺側の代償機能として健常側で補う努力がなされていた。つまり、脳細胞は酸素不足や虚血に対し脆弱であり、脳梗塞による虚血によって失った機能は再生しないと考えられていた。しかし、脳内の新生細胞の発見により、新たなシナプス形成や神経回路再構築の可能性が期待され、脳梗塞に対する再生医療やリハビリが積極的に行われるようになった。

一方、脳梗塞時における虚血・再還流障害においては、ミトコンドリア機能不全を誘導し、電子伝達系の不安定によってスーパーオキシドラジカルの生成やビタミンC(アスコルビン酸)やグルタチオンなどの抗酸化物質の減少を招くことが報告されている。生体における活性酸素の生成系と消去系のバランスの崩壊(酸化ストレス)が、脳梗塞後遺障害の悪化を招く要因となっている。そのため、脳梗塞のような病態からの改善に、リハビリが酸化ストレスにどのような影響を与えるのかを調べる必要がある。これまでの報告において、咬合・咀嚼が生体の酸化ストレスに影響を及ぼしていることを考慮すると、脳梗塞後における咬合・咀嚼機能といったリハビリの導入が、酸化ストレス状態の軽減に貢献できる可能性は高いと考えられる。また、咀嚼筋や歯からの固有感覚性インパルスが三叉神経中脳路核によって伝達されることもあり、咀嚼運動に関連した神経伝達経路を特異的に刺激することで、その刺激に対する脳への反応を明確に示すことが可能となると予想される。

2. 研究の目的

本研究では、『咬合・咀嚼機能が脳梗塞後遺障害後の脳内抗酸化能の低下の回復に寄与する』との仮説のもと、脳梗塞モデルラットを用いて咬合・咀嚼による脳内抗酸化能の回復について検討し、仮説を立証する。

3. 研究の方法

(1) 脳虚血・再還流モデルラットの作製

小泉らの方法に従い、右側中大脳動脈梗塞モデルラットを作製する。脳梗塞発症後2時間が経過した時点で、感覚運動機能評価(Limb Placement Test)を用いて、障害の有無を確認する。

(2) 高速液体クロマトグラフィー(HPLC-ECD法)による脳内抗酸化物質(アスコルビン酸、尿酸)の定量

健常ラットと脳梗塞モデルラットの脳内

抗酸化物質を HPLC-ECD 法にて測定する。なお脳梗塞モデルラットは大脳半球(梗塞側と健常側)に分けて測定する。

(3) 下顎神経の舌神経への人工的電気刺激の確立

下顎神経の舌神経を露出させ、20Hz、20Vで10秒間の単回刺激を実施する。

(4) 脳梗塞モデルラットにおいて、実験群(固形飼料飼育摂取群、人工的電気刺激群)と対照群(液体飼料飼育群)との比較

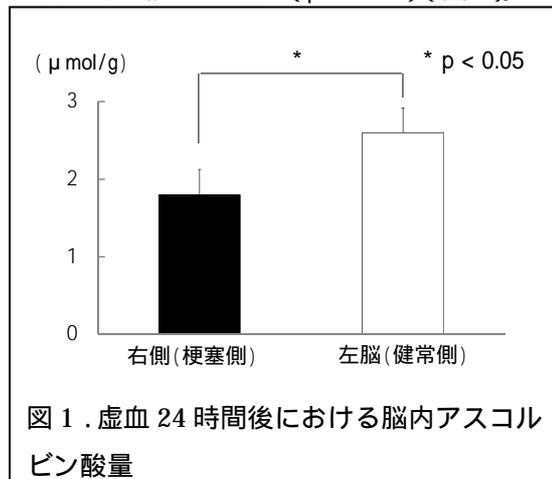
脳梗塞モデルラットを、固形飼料を摂取する実験群、咀嚼に関連する神経への人工的電気刺激を誘発する実験群、液体飼料を摂取する対照群に分け、脳内抗酸化物質を HPLC-ECD 法にて測定し比較する。

4. 研究成果

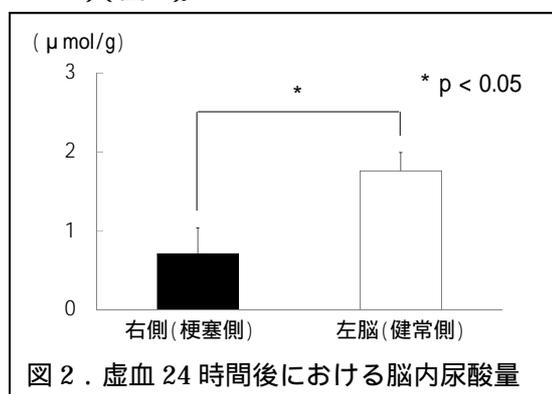
(1) 脳梗塞モデルラットと健常ラットにおける脳内抗酸化能～健常側と梗塞側の比較～

8週齢のWistar/ST雄性ラットに対し脳梗塞モデルラットを作製した。

脳梗塞モデルラットの同一個体の脳を右(梗塞側)と左(健常側)に分割し、一定期間経過時における脳内アスコルビン酸の変化を測定した。その結果、脳梗塞発症後24時間経過時において、健常側と比較して梗塞側でのアスコルビン酸量が有意に低下していることが認められた($p < 0.05$)(図1)。



同様に、健常側と比較して梗塞側での尿酸量が有意に低下していることが認められた($p < 0.05$)(図2)。

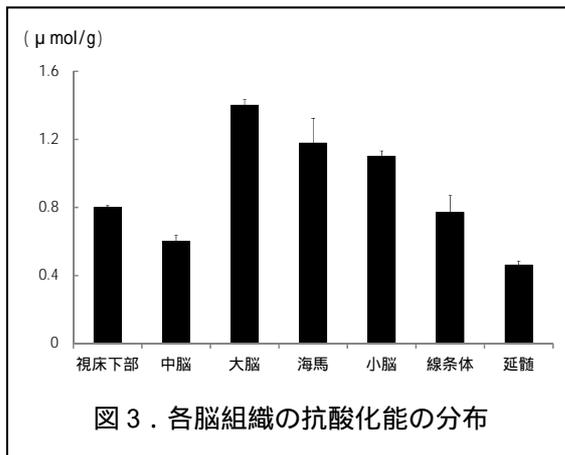


また、脳梗塞発症後 8 週が経過した時点においても同様の結果が得られた ($p < 0.05$)。一方、健常ラットの同一個体の脳を右(健常側)と左(健常側)に分割し、脳虚血モデルラットと同様の条件にて測定した結果、左右差は認められなかった。脳梗塞発症により、脳内抗酸化能が低下していることが認められた。

本法で用いた HPLC-ECD 法は、内部標準物質として DHBA を用い、クロマトグラムのピーク高さは内標準法により算出した。

(2) 健常ラットの脳内抗酸化能の分布状況

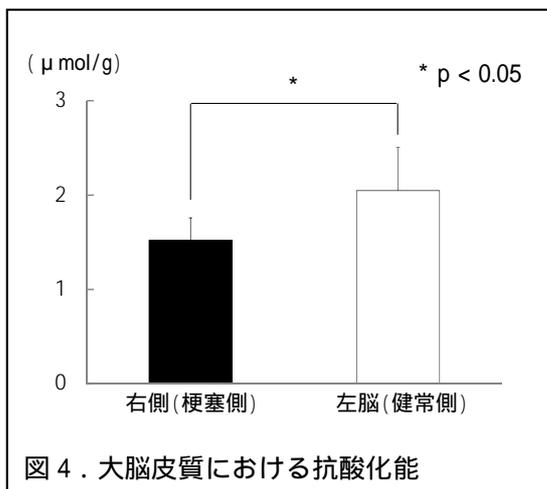
脳内抗酸化物質の分布状況を把握するため、Glowinski らの方法に従い脳を 7 分割(大脳皮質、線条体、海馬、中脳、小脳、視床下部、延髄)し、各脳組織の抗酸化能の測定を行った(図 3)。



その結果、咀嚼機能と関連の高い大脳皮質と海馬の抗酸化能が高い傾向にあることが示された。

そこで、咀嚼機能と関連の高い大脳皮質と海馬に着目し、咀嚼刺激との関連を検討することとした。

(3) 脳梗塞モデルラットの大脳皮質と海馬における脳内抗酸化能 ~ 健常側と梗塞側の比較 ~



大脳皮質では、健常側と比較して梗塞側で有意に低下していることが認められた ($p < 0.05$)(図 4)。一方、海馬では両側間に有意

な差は認められなかった。これは、本研究で作製する脳梗塞モデルラットが、海馬を直接虚血しないため、左右の抗酸化能に差が認められなかったと考えられる。

(4) 脳梗塞モデルラットにおける咀嚼動態の差異が脳内抗酸化能に及ぼす変化

固形飼育飼料を摂取する群(固形)の大脳皮質の健常側と梗塞側のアスコルビン酸量を、液体飼育飼料を摂取する群(液体)と比較した結果、有意な差は認められなかった。

一方、尿酸量では、固形が液体と比較して、大脳皮質の右側(健常側)と左側(梗塞側)の両者において、有意に高い値を示した ($p < 0.05$)(図 5、6)。

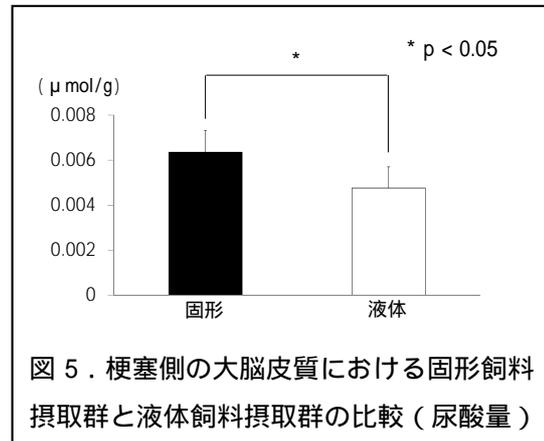


図 5. 梗塞側の大脳皮質における固形飼料摂取群と液体飼料摂取群の比較 (尿酸量)

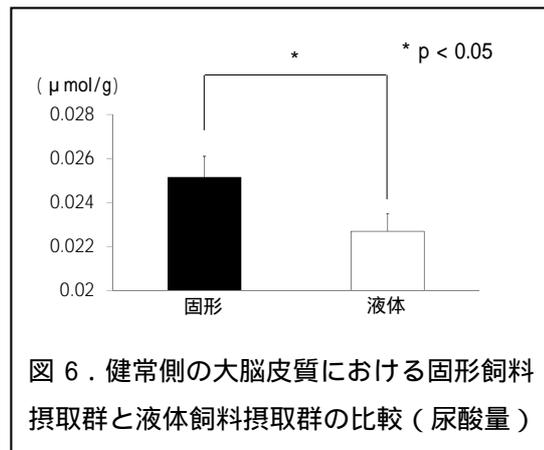


図 6. 健常側の大脳皮質における固形飼料摂取群と液体飼料摂取群の比較 (尿酸量)

(5) 脳梗塞モデルラットにおける人工的電気刺激が脳内抗酸化能に及ぼす変化

下顎神経の舌神経を露出させて、20Hz、20V を 10 秒間の単回刺激を行ったが、アスコルビン酸量と尿酸量にとくに変化は認められなかった。

(6) 今後の展開・課題

今回の結果では、咬合・咀嚼刺激による脳内アスコルビン酸への影響は認められなかったものの、尿酸において、咀嚼による良好な結果が得られた。すなわち固形飼料摂取に伴う咀嚼刺激は、脳梗塞後の脳内抗酸化能の低下からの回復に寄与している可能性が示唆され、咀嚼は脳梗塞後のリハビリテ ショ

ンとして役立つことが予想された。ただし、同一動物の脳内抗酸化能の状況を継続的に計測することができていないため、今後は血液サンプルも併せて経時的に計測する必要があると考える。また、本研究で実施した方法は in vitro であり、サンプリング後は酸化によって測定結果に変動をきたす可能性があることから、in vivo で継続的にサンプリングできるマイクロダイアリシスの導入が必要である。

今回、人工的な電気刺激を実施したものの、十分な結果が得られなかった。今後はさらに長期的な反復刺激が必要であると考えます。

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)

[学会発表](計 4 件)

川西克弥、佐々木みづほ、菅 悠希、豊下祥史、佐久間孝二、奥田耕一、山中隆裕、小西洋次、高崎英仁、伊東由紀夫、會田英紀、越野 寿、脳梗塞モデルラットの摂食行動の差異が脳内抗酸化能に及ぼす影響、平成 25 年度公益社団法人日本補綴歯科学会東北・北海道支部総会・学術大会、2013 年 10 月 13 日、札幌市

川西克弥、佐々木みづほ、豊下祥史、菅 悠希、會田英紀、越野 寿、咀嚼動態の差異が脳内抗酸化能に及ぼす影響について、日本咀嚼学会第 24 回総会・学術大会、2013 年 10 月 5 日・6 日、新潟市

佐々木みづほ、川西克弥、豊下祥史、會田英紀、大市佳史、越野 寿、脳梗塞モデルラットの脳内における細胞増殖への咀嚼の影響、日本咀嚼学会第 23 回総会・学術大会、2012 年 10 月 14 日、札幌市

佐々木みづほ、川西克弥、豊下祥史、會田英紀、越野 寿、脳梗塞モデルラットにおける海馬歯状回の細胞増殖への咀嚼の影響、日本老年歯科医学会第 23 回学術大会、2012 年 6 月 23 日、つくば市

6 . 研究組織

(1)研究代表者

川西 克弥 (KAWANISHI . Katsuya)

北海道医療大学・歯学部・講師

研究者番号：1 0 4 3 8 3 7 7