

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20592273

研究課題名(和文) 咬合・咀嚼障害が血清抗酸化能に与える影響についての研究

研究課題名(英文) Influence of occlusal interference and masticatory disturbance on antioxidant capacity in serum

研究代表者

田中 真樹 (TANAKA MAKI)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：40207139

研究成果の概要(和文)：

咬合・咀嚼は健康の維持に不可欠な因子の一つで、機能が正常に営まれなくなると、生体に対しストレスとなり様々な影響を及ぼす。一方、精神的・身体的ストレスによってスーパーオキシドなどのフリーラジカルが増加し、種々の疾患が惹起されることが明らかになっている。そこで本研究では、ラットの咀嚼動態を固形から液体へ変更する咀嚼障害や、咬合干渉による咬合障害が、酸化ストレスを誘導するか否か検討した。その結果、好中球のスーパーオキシド産生能の増強および、血清 SOD 活性の低下が認められた。すなわち、噛むことが習性であるラットの液体飼料飼育や咬合干渉がストレスとなり、生体に対して酸化ストレスを誘導することを証明した。

研究成果の概要(英文)：

Occlusion and mastication are indispensable factors in maintaining health, and when these functions are not normally practiced, stress is put on the body, causing various affects. Meanwhile, it has been verified that free radicals such as superoxide increase due mental/physical stress, thus evoking various diseases. Therefore, in this study, we investigated both the occurrence of a mastication disturbance which requires changing the breeding feed of rats from solid to liquids, and also the presence of occlusal interference due to the premature contact. As a result, the superoxide production ability of neutrophil was enhanced while the serum superoxide dismutase (SOD) activity declined. That is to say, the feeding of liquid feed and occlusal interference became stressors to rats that normally chew, and this was proven to induce oxidative stress in the body.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000円	540,000円	2,340,000円
2009年度	700,000円	210,000円	910,000円
2010年度	900,000円	270,000円	1,170,000円
年度			
年度			
総計	3,400,000円	1,020,000円	4,420,000円

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：咬合,咀嚼,活性酸素,抗酸化

## 1. 研究開始当初の背景

円滑で調和のとれた咬合・咀嚼機能の営みは、Quality of life (QOL) の確立に重要な因子の一つで、生体情報伝達系である「神経系-内分泌系-免疫系」を賦活し、生体のホメオスタシスに深く関与している。一方、身体的や精神的なストレスにより、生体で活性酸素種 (reactive oxygen species ; ROS) の産生が亢進し、酸化力が抗酸化力を上回った状況、つまり、酸化ストレスが誘導されることが明らかとなっている。

ROS は反応性が強く、様々な酸化傷害を引き起こすが、生体には活性酸素を不活性化する抗酸化防御機構が備わっている。しかし、活性酸素量と抗酸化能とのバランスが崩れて前者が増加した場合には、生体諸組織の細胞や血液が酸化状態となる。その結果、酸化ストレスにおけるレドックスバランスが破綻する。ROS は臓器の機能異常を起こすため、虚血性疾患、脳神経疾患、肝疾患や 発癌などの発症および増悪因子として、注目されている。

医歯薬学分野において、国内・国外を通じ咬合・咀嚼機能が活性酸素の産生に影響を及ぼしているか否か、また、咬合・咀嚼障害と抗酸化能との間に関連があるかについて、検討した報告はみられない。

## 2. 研究の目的

健康科学の一分野として、咬合・咀嚼の重要性を検証することが重要である。本研究は「ラットの咬合・咀嚼動態の変化は、酸化ストレスを誘導する」との仮説のもとに、咬合・咀嚼が、健康および QOL へ果たす役割の一つとして、酸化ストレスと咬合・咀嚼の関連性を検討した。ラットの咀嚼動態を液体飼料のみを摂取させた咀嚼障害モデルと、臼歯部に接着性レジンを追加した咬合干渉モデルを作製し、活性酸素発生機構 (産生系) として好中球  $O_2^-$  生成能、さらに、防御代謝機構 (消去系) である血清 SOD 活性の両面から生体の酸化ストレスを評価し、仮説を検証した。

## 3. 研究の方法

### (1) 実験動物と飼育条件

実験動物は、9 週齢の Wistar 系雄性ラットを用いた。飼育環境は 1 ケージ 2 匹で飼育し、飼料と水は自由摂取とした。すべてのラットは、通常の固形飼料で飼育を開始した。

飼育条件①: 通常の固形飼料で飼育を開始し、10 週齢になった時点で、ヒト経腸栄養剤エンシュアリキッドで飼育する液体飼料飼育群と、同一成分の固形飼料を用いる固形飼料飼育群の 2 群を設定した。

飼育条件②: 10 週齢になった時点で、液体飼料飼育群と固形飼料飼育群の 2 群を設定し、飼育飼料変更後 4 週目以降に、液体飼料飼育群では、液体飼料から通常の固形飼料へと戻した。

飼育条件③: 咬合挙上群と通常ラット (対照群) の 2 群を設定し、挙上開始後、4 週間飼育した。

### (2) 血中カテコールアミン濃度の測定法

アドレナリン、ノルアドレナリンおよびドーパミン濃度の測定は、尾部より採血を行い血漿を回収後、電気化学検出器付高速液体クロマトグラフィー (HPLC-EC) を用いアルミナ吸着法で行った。

### (3) 好中球 $O_2^-$ 生成能の測定法

$O_2^-$  生成能は、二波長分光光度計を用いてシトクロム c (Cyt c) 還元法で測定した。ジエチルエーテル麻酔下において、5% カゼイン溶液を腹腔内投与し、16 時間後に好中球を含む腹腔内滲出液を回収した。下層の細胞層を 0.1% NaCl 溶液 (低張) と 1.7% NaCl 溶液 (高張) で溶血後、リン酸緩衝液で洗浄し、好中球懸濁液を作製した。好中球懸濁液 ( $1 \times 10^7$  cells/ml) に Cyt c (1 mg/ml) (Sigma) を添加し、刺激前のベースラインを記録した。PMA を好中球懸濁液に加えて攪拌することで、Cyt c との還元反応を開始させ、550 nm の吸光度の増加 (Cyt c 還元速度) を 10 分間計測した。好中球の  $O_2^-$  生成能 (nmol/min/ $10^7$  cells) は、計算式 [各測定で得られた反応曲線の最大傾斜線の傾き ÷ Cyt c の吸光度係数  $19.1 \times 1000$  と、 $1 \times 10^7$  cells/ml  $\times 0.2$  ml (好中球懸濁液添加

量)]を用いて、 $10^7$  cells 当たりで算出し、その平均値を求めた。

#### (4) 血清 SOD 活性の解析法

ジエチルエーテル麻酔下で尾部より採血を行い、血清を回収した。測定には、電子スピン共鳴装置 (Electron Spin Resonance spectrometer, 日本電子) を使用した。 $O_2^-$  産生は、hypoxanthine (和光純薬) と xanthine oxidase (Roche),  $O_2^-$  の捕捉剤は CYPMP0 (ラジカルリサーチ), 安定剤には DTPA (Sigma) を用い、電子スピン共鳴 (ESR) ・スピントラッピング法で  $O_2^-$  の消去能を測定し、評価した。すなわち、マイクロチューブに、リン酸緩衝液 (100 mM), CYPMP0 (200 mM), DTPA (100 mM), HX (10 mM) および、血清と XOD (10 mM) を加え  $30^\circ\text{C}$  で 5 分間静置させた。30 秒後より、CYPMP0-スーパーオキシド-スピニングアダクトのシグナル強度を得た。解析は、リン酸緩衝液による ESR スペクトラム量を 100% とし、血清のそれは、計算式 [血清のスーパーオキシド抑制率 = control - sample/sample ; control (リン酸緩衝液), sample (血清)] で求めた。得られた各検体の抑制率を、ウマ赤血球由来の標準 SOD (Sigma) で作成した検量線を用いて解析し、血清 SOD 活性を得た。

#### (5) 好中球 NADPH オキシダーゼ系タンパク p47<sup>phox</sup> の解析法

飼料変更後 7 日目のラットから好中球を採取し、超遠心法で細胞膜と細胞質に分画後、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動した。ニトロセルロースメンブレンに転写後、一次抗体ラット抗 p47<sup>phox</sup> (BD Transduction Laboratories) と二次抗体アルカリフォスファターゼ標識 anti-rabbit IgG antibody (invitrogen 社製) を反応させ、アルカリフォスファターゼ chemiluminescence system (invitrogen) で発色し、chemiDoc XRS system (BIO-RAD) を用いて検出した。

#### (6) 咬合挙上群の血清 SOD 活性の解析法

ジエチルエーテル麻酔下で、ラット上顎臼歯部 (第 1 臼歯, 第 2 臼歯, 第 3 臼歯) の両側咬合面を良く乾燥させて歯面処理後、歯科用接着性レジン (サンメディカル) を約 1 mm の高径で築盛し、咬合挙上モデルラット (咬合挙上群) を作製した。

#### (7) 統計処理

各群間における平均値の差を用いて、

一元配置分散分析を行い、Tukey-test で検定した。有意差基準は、 $p < 0.05$  とした。

## 4. 研究成果

### (1) 固形から液体への飼料形態の変化は、血中カテコールアミン濃度を上昇させる。

液体飼料へ変更後 7, 14, 21, 28 日目において、血中アドレナリンとノルアドレナリン濃度は、固形飼料飼育群に比べ液体飼料飼育群で有意に増加していた ( $p < 0.05$ ) (図 1)。一方、血中ドーパミン濃度は、両群とも測定感度未満であった。

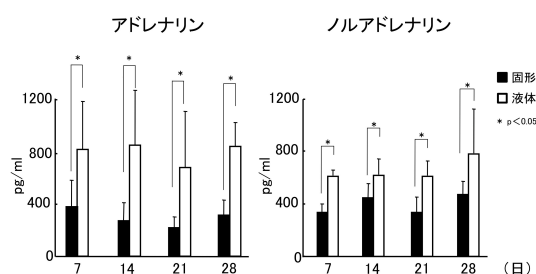


図 1 固形飼料 (n=8) と液体飼料飼育 (n=8) の血中アドレナリンおよびノルアドレナリン濃度

### (2) 固形から液体への飼料形態の変化は、好中球の $O_2^-$ 生成能 (活性酸素産生系) を亢進する。

液体飼料へ変更後 1, 2, 3 週目において、液体飼料飼育群では固形飼料飼育群と比較し、好中球  $O_2^-$  生成能は有意に亢進していた ( $p < 0.05$ )。飼料変更後 4 週目には両群で有意差はなかったものの、液体飼料飼育群の好中球  $O_2^-$  生成能は同様に高かった (図 2)。

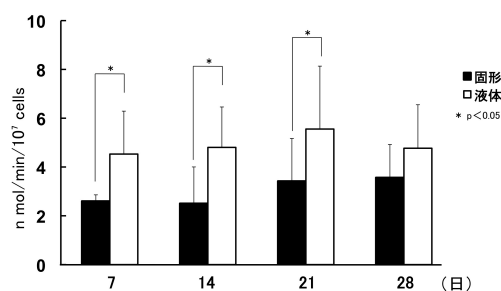


図 2 固形飼料 (n=8) と液体飼料飼育 (n=8) の好中球  $O_2^-$  生成能

### (3) 固形から液体への飼料形態の変化は、血清 SOD 活性 (活性酸素消去系) を低下させる。

液体飼料へ変更後、7 日目、14 日目では両群に有意差を認めなかった。しかし、21 日目以降 8 4 日目まで、液体飼料飼育群の血清 SOD 活性は、

固形飼料飼育群と比べ有意に低下していた ( $p < 0.05$ ) (図 3)。

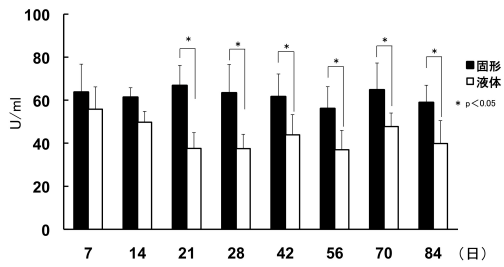


図 3 固形飼料 (n=8) と液体飼料飼育 (n=8) の血清 SOD 活性

さらに、液体飼料飼育から固形飼料飼育へと、飼育飼料形態を元に戻した際の血清 SOD 活性を検討した。すなわち、10 週齢で飼料変更を行い、固形飼料飼育群と液体飼料飼育群の 2 群を設定した。飼育飼料変更後 4 週目に、液体飼料飼育を固形飼料へと戻し、血清 SOD 活性を解析した。飼育飼料変更後 3, 4 週目において、液体飼料飼育群は固形飼料飼育群と比較し、血清 SOD 活性は有意に低下していた。しかし、飼育飼料を固形飼料飼育へ戻すと、1 週目以降には固形飼料で飼育し続けた群と同程度まで血清 SOD 活性は回復した (図 4)。

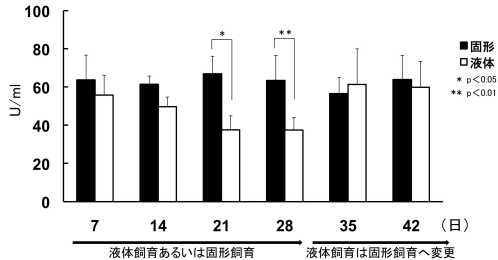


図 4 液体飼料から固形飼料へと飼育飼料を戻した際の血清 SOD 活性 (n=8)

(4) 飼料形態の変化は、好中球 NADPH オキシダーゼ系タンパク p47<sup>phox</sup> の膜移行を亢進させる。

固形飼料飼育群では、細胞質と細胞膜の p47<sup>phox</sup> 発現に差異はなかった。一方、液体飼料飼育群の p47<sup>phox</sup> 発現は、細胞質で減少し、細胞膜では逆に増加していた (図 5)。

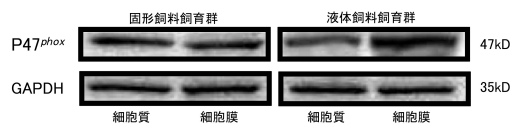


図 5 固形飼料飼育群と液体飼料飼育群の好中球 (細胞質, 細胞膜) における p47<sup>pho</sup> の発現

(5) 咬合挙上は、血清 SOD 活性を低下させる。

通常の固形飼料で飼育を行い、1 週間隔で血清 SOD 活性を解析した。咬合挙上群では対照群と比較し、1 週目以降で血清 SOD 活性は有意に低下した ( $p < 0.05$ ) (図 6)。

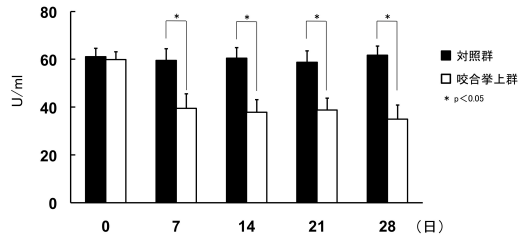


図 6 咬合挙上を施したラット (n=8) における血清 SOD 活性の経時的変化

以上より、飼料形態の変更による咬合・咀嚼障害がストレスとなり、活性酸素産生系と消去系のバランスが崩壊する酸化ストレス状態の誘導が起こることが証明された (図 7)。生体の健康を維持・増進するためには適正な咬合・咀嚼機能の保持が不可欠であり、咬合・咀嚼機能障害を持つ患者においても、早期治療が QOL の維持・増進に貢献すると考えられた。

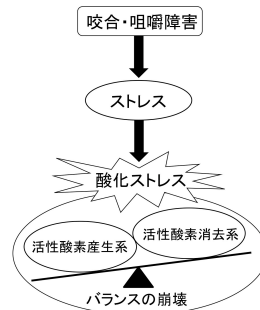


図 7 咬合・咀嚼障害とホメオスタシスの相互関係

## 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 2 件)

1. Kawanishi K, Koshino H, Toyoshita Y, Tanaka M, Hirai T. Effect of Mastication on Functional Recoveries after Permanent Middle Cerebral Artery Occlusion in Rats. Stroke Cerebrovasc Dis. 査読有; 9: 398-403, 2010.

2. Koshino H, Hirai T, Yokoyama Y, Tanaka M 他 3 名 4 番目. Mandibular Residual Ridge Shape and Masticatory Ability in Complete Denture Weares. J Jpn Prosthodont Soc. 査読有; 52: 488-493, 2008

[学会発表] (計 6 件)

### 1. 田中真樹

ラットの液体飼料飼育は血清 SOD 様活性を低下させる. 第 50 回日本臨床化学会年次学術集会. 2010 年 9 月 24 日, 甲府市 県民文化ホール.

### 2. 鈴木裕仁(田中真樹)

ラットの液体飼料飼育は血清 SOD 様活性を低下させる. 第 25 回日本ストレス学会. 2009 年 12 月 5 日, 横浜市 横浜開港記念会館.

### 3. 田中真樹

ラットの液体飼料飼育による咀嚼動態の変化は酸化ストレスを誘導する. 第 49 回日本臨床化学会年次学術集会. 2009 年 9 月 19 日, 長崎市 長崎大学.

### 4. 田中真樹

ラットの液体飼料飼育は酸化ストレスを誘導する. 第 24 回日本ストレス学会. 2008 年 10 月 31 日, 豊中市 千里ライフサイエンスセンター.

### 5. 鈴木裕仁(田中真樹)

ラットの液体飼料飼育は酸化ストレスを誘導する. 第 19 回日本咀嚼学会. 2008 年 9 月 17 日, 東京都 早稲田大学.

### 6. 川西克也(田中真樹)

ラットにおける咀嚼動態の変化が血清抗酸化能とスーパーオキシド産生能に及ぼす影響. 第 117 回日本補綴歯科学会学術大会, 名古屋市 国際会議場. 2008 年 6 月 8 日.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

田中 真樹 (TANAKA MAKI)  
札幌医科大学・医学部・助教  
研究者番号: 40207139

### (2) 研究分担者

平井 敏博 (HIRAI TOSHIHIRO)  
北海道医療大学・個体差医療科学センター  
・教授  
研究者番号: 80014273

越野 寿 (KOSHINO HISASHI)  
北海道医療大学・歯学部・教授  
研究者番号: 90186669

豊下 祥史 (TOYOSHITA YOSHIFUMI)  
北海道医療大学・歯学部・講師  
研究者番号: 20399900

渡邊 直樹 (WATANABE NAOKI)  
札幌医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 10158644

栗林 景晶 (KURIBAYASHI KAGEAKI)  
札幌医科大学・医学部・講師  
研究者番号: 50381257

